ORIGEM DOS LATICÍFEROS DO EMBRIÃO DE *EUPHORBIA PULCHERRIMA*, Willd.

por

F.R. MILANEZ
Chefe da S.B.G.

e

H. MONTEIRO NETO
da S.B.G.

Introdução

Trata o presente estudo da origem dos laticíferos no embrião de *E. pulcherrima*: o modo de formação dêsses tubos e de seus ramos representa, pois, o principal escopo das observações aqui relatadas. Teremos, infelizmente, que repetir muitas vêzes que tal processo consiste na fusão de protoplastas. Essa reiteração se justifica por ter sido negada, por muitos pesquisadores, a realidade dessas fusões. Demonstrando-as no próprio embrião, terreno onde SCHMALHAUSEN lançou as bases, logo reforçadas por SCHULLERUS e CHAUVEAUD, da sua teoria ainda hoje em voga, esperamos completar a rehabilitação, iniciada por um de nós com trabalhos anteriores (7), (9), (10), do esquema ontogenético de UNGER e DIPPEL que, fora de dúvida, apresenta perspectivas muito mais conformes com os outros fatos ontogenéticos já conhecidos.

A teoria das fusões celulares como explicação da estrutura e formação dos laticíferos, aparecida pela primeira vez em 1840 em trabalho de UNGER (18), foi desde o início for-

* Entregue para publicação a 15-7-56.

temente combatida. Já no ano seguinte a dissertação de SCHULTZ (15) continha o seguinte reparo (pg. 222): "An den Formen derselben sieht man auf's deutlichste, wie unrichtig die Vorstellung einiger neuren Forscher ist, dass alle Gefässe aus sich aneinander reihenden und ineinander öffenden Zellen entstehen sollten".

Depois dos conceitos extravagantes de um ANÔNIMO (1) e de SCHACHT (11) predominava o ponto de vista de UNGER, mercê dos trabalhos premiados de DIPPEL (4) e HANSTEIN (6), tal como foi resumido por um dos signatários (7) e (10), quando surgiram os resultados das pesquisas de DAVID (3). De suas conclusões destacamos: "5. Sie entstehen aus einzelnen Zellen, welche auf hören sich zu teilen und in die Länge wachsen, wobei sie in die Intercellularräume hineinwachsen und durch die Streckung des Stengels in die Länge gezogen werden. Sie sind also Zellen, nicht Zellfusionem". Aqui estão os fundamentos da concepção de SCHMALHAUSEN que os transferiu para a fase embrionária: "células laticíferas" que cessam de dividir-se e se alongam, penetrando nos espaços intercelulares. Se acrescentarmos a êsses o crescimento apical, pràticamente indefindo, comum às hifas, teremos os elementos principais de que se serviu SCHMALHAUSEN para estabelecer a sua célebre teoria.

É curioso notar, no entanto, que SCHMALHAUSEN (13) faz críticas, aliás justas, ao método de DAVID: reconhece que a maceração com potassa e as manipulações que se seguem não são apropriadas ao estudo dos tecidos jovens, como os meristemas; que os supostos primeiros estádios das células laticíferas deveriam ser simples elementos do meristema, ao passo que as células de latex isoladas, seriam apenas fragmentos de tubos ramificados. Esquece-se, entretanto, que havia tomado por bons seus resultados quando afirmara, linhas antes (13): "Dass die Milchsaftschläuche hier eine andere Entwicklung haben, wird noch klarer aus der Arbeit David's, in welcher sie als milchsaftführenden Zellen bezeichnet ...". Seja como fôr, o conceito de inicial laticífera de DAVID, de bases experimentais reconhecidas como precárias pelo próprio SCHMALHAUSEN, no meristema apical, foi por êste adotado para o embrionário. Até então sòmente

existia, sôbre laticíferos nos embriões, curta informação de TRÉCUL (17) a respeito da presença dos mesmos no hipocótilo e cotilédones de *Asclepias cornuti* e de alguns outros representantes da família, bem como, de *Euphorbia Lagascae* (13). O mérito principal de SCHMALHAUSEN foi o de lançar-se à investigação dos laticíferos nos embriões de algumas Euforbias (e também de várias outras plantas de diversas famílias que não interessam ao presente estudo) em diferentes fases do desenvolvimento, a despeito das deficiências da técnica microscópica da época. Se pensarmos que os cortes tinham de ser feitos à mão livre e que poucos eram os reagentes então disponíveis para melhorar a observação, tendentes todos a remover ou destruir os conteúdos celulares, compreenderemos plenamente os resultados conseguidos.

Distinguia êle as iniciais laticíferas — *Urzellen der Milchsaftgefässe* — desde a fase em que começam a delinear-se as duas saliências dos cotilédones (forma em coração) em virtude do maior volume celular e da refringência das paredes. A seguir, tais células mais conspícuas se tornavam porque, ao contrário das outras, cresciam sem se dividir. Começavam, então, a enviar prolongamentos ou projeções (ramos) que eram dotados de crescimento apical autônomo e penetravam nos espaços intercelulares. Alguns dêsses ramos descreviam arcos no plano de inserção dos cotilédones e aí (os das várias células laticíferas) se entrelaçavam formando anel. Êste corresponderia a verdadeiro plexo nodal, tanto mais que haveria anastomose, isto é, fusão dos diversos troncos nesse plano (13, pg. 10): "Wahrscheinlicher ist es mir, dass eine Verbindung der Schläuche stattfindet, um dass durch den Ring eine Verbindung sammtlicher im Embryo vorhandenen Hauptschläuche hergestellt wird".

É importante notar que várias vêzes se refere SCHMALHAUSEN às fusões, porque no trabalho, antes citado, DAVID negara expressamente sua ocorrência. À pg. 9 por exemplo, " ... dass 2 Hauptstämme mit ihren noch fort waschsenden Spitzen aneinander stossen und mit einander verschmelzen ..."; pg. 12: "In einzelnen seltenen Fallen findet

man Verbindungen zwischen den äusseren und den inneren Schläuche der Wurzelendes"; e diversas outras vêzes, ainda, quando trata do retículo laticífero que descobriu sob a epiderme dos cotilédones, como, p. ex. à pg. 9: "... und in Aeste überzugehen scheinen, welche unter der Epidermis ein Netz von feinen Milchsaftschläuchen bilden".

Pensava êsse Autor que a faculdade de crescer e de emitir ramos fôsse privativa das extremidades jovens, situadas em tecidos meristemáticos: (13, pg. 17) "Die Milchsaftschläuche der *Euphorbien* wären demnach vielleicht nicht unpassend mit intercellularwachsenden parasitisch in dem Gewebe sich verbreitenden Pilzhyphen zu vergleichen, mit dem Unterschiede jedoch, dass sie nur in meristematischen Gewebe wachsen und sich verzweigen, bald aber die Fähigkeit, Seitenäste zu treiben, verlieren". Quanto à comparação com hifas parasitas, já vimos como deve ter influído na aceitação da teoria (7).

Finalmente, julgava SCHMALHAUSEN (13, pg. 25) que todo o sistema laticífero das *Euphorbiaceae, Asclepiadaceae* e *Apocynaceae* proviesse do desenvolvimento das células precocemente diferenciadas no embrião e que novas células laticíferas não mais se formariam depois daquela época.

SCHULLERUS (14) no seu célebre trabalho sem gravuras, empenhou-se, no que concerne ao desenvolvimento embrionário dos laticíferos, a corrigir o que lhe parecia errôneo nas conclusões de SCHMALHAUSEN, depois de concordar com êle quanto ao fato essencial: "..., und es hat sich in Uebereinstimmung mit Schmalhausen als Resultat ergeben, dass das Grösserwerden der Milchsaftschläuche nicht durch Verschmelzung benachbarter Zellen miteinander zu Stande kommt, sondern durch Auswachsen einzelner Zellen, Urmilchzellen zu Schläuchen, deren Spitzenwachstum dieser Schläuche, etc..."

É assim que se insurge contra a suposta ausência dos laticíferos nas radículas, afirmando (14 pg. 47): "dass alle Wurzeln bis in ihre Enden Milchsaftschläuche bezitzen ..." Essa circunstância, assim como a presença de laticíferos nos primórdios de rebentos laterais, levam-no à conclusão de que a analogia com as hifas é maior do que supunha o próprio

Schmalhausen, e ainda, de que como estas, não necessitam os tubos para seu crescimento, que o tecido em que se encontram esteja também crescendo. Descreve com minúcias a origem dos laticíferos das radicelas.

Difícil de entender-se, a não ser por motivos teóricos, é sua intransigência com respeito às anastomoses. Recusa-se a aceitar, inclusive, o anel laticífero do plexo nodal (14 pg. 41): "Anastomosen finden sich aber weder in der Axe noch in den Kotyledonen ... Auch von einem Ring, der nach Schmalhausen im Knoten des Embryo ausgegen einander wachsenden Fortsätzen des Urzellen der Milchsaftschläuche entstehen soll, fand ich keine Spur, weder im Embryo noch in einer Keimplanze ..." Nem uma palavra diz sôbre o retículo subepidérmico de Schmalhausen, porque, para êle, as ramificações dos cotilédones terminam sob a paliçada: (14 pg. 41) "Alle endigen höchstens unter dem einschichtigen Pallisaden Parenchym, ...". As formas em H, geralmente tomadas como prova de anastomose, êle as declara frequentes no eixo dos rebentos adventícios, mas explica sua formação por um processo inverossímil: um tubo daria um ramo perpendicular, (radial em relação ao eixo) que após curto trajeto, por uma espécie de dicotomia viria a produzir dois outros ramos, perpendiculares, ambos, ao que lhes dera origem, situados exatamente na mesma direção, simulando um só tubo. Nesta explicação, como em várias outras passagens, considera como fato predominante da distribuição dos tubos a resistêcia maior ou menor que os mesmos encontravam nos tecidos mais compactos ou mais frouxos: assim, à pg. 36: "... zugleich wurde das parenchymatischer Gewebe lockerer, welcher Umstand die Milchzellen nun auch zu einen Wachsthum in die Kotyledonen hinein anregte"; e mais adiante, à pg. 40: 'Verzweigungen finden sich erst in dem oberen Teile des hypokotylen Gliedes, wo das Gewebe lockerer ist".

Acrescentemos, porém, que o trabalho de Schullerus não se limitou ao estudo morfológico do desenvolvimento de algumas Euforbias; seus capítulos mais interessantes dizem respeito ao próprio latex, inclusive em várias fases da vida do vegetal.

Ao contrário, a tese de CHAUVEAUD (2) é exclusivamente morfológica: êle se compraz em descrever minuciosamente a origem do sistema laticífero em várias espécies de *Euphorbia* (e de vários outros gêneros que no momento não nos interessam) procurando tirar, é exato, algumas conclusões de importância na taxinomia. Adota, quanto à formação dos tubos, os princípios estabelecidos pelos dois autores que o precederam; quando ambos divergem, tenta explicar as discrepâncias, exceto no caso das radicelas, em que se coloca decididamente do lado de SCHULLERUS. Na questão das anastomoses, admite a existência do anel em *E. peplus* que não foi estudada por SCHULLERUS, razão por que o rejeitou; mas, concorda com êste em que não há verdadeira anastomose (2, pg. 44): "Comme ils décrivent autant d'arcs à la périphérie du cylindre central, il en resulte que leur ensemble forme un anneau entourant celui-ci. C'est l'aspect qui a été figuré par M. Schmalhausen. Mais cet Auteur, trompé par l'apparence, a representé un anneau veritable formé d'après lui, par la fusion des prolongements arrivés en contact". Semelhante é sua atitude na discordância relacionada com o retículo subepidérmico; admite que os ramos cheguem sob a epiderme, mas supõe que não se deem fusões: (2, pg. 48) "Ils s'elevent sous l'epiderme à l'interieur des cotylédons, et fournissent de petits rameaux dont les uns s'égarent au milieu du parenchyme, tandis que les autres demeurent sous l'epiderme, où ils s'enchevêtrent en donnant l'apparence d'un reseau. Mais nulle part ils ne s'anastomosent entre eux, et l'on ne peut accepter l'opinion de M. Schmalhausen à ce sujet".

O mais recente trabalho a considerar o mesmo assunto, foi, estamos quase certos, o de SCHAFFENSTEIN (12). Nas primeiras páginas expõe o Autor pesquisas realizadas nos embriões de *E. myrsinites* e *E. bojeri*, pois reconhece que, em virtude da técnica usada por SCHMALHAUSEN e CHAUVEAUD, "... war von der feineren Differenzierung der Milchröhreninitialen bisher nichts bekannt". Dessas iniciais, entretanto, sòmente nos diz que eram maiores que as células

vizinhas, providas de núcleo também maior e núcleolo surpreendentemente volumoso; o citoplasma seria insignificante. Quanto ao resto, confirma os resultados anteriores.

II — *Material e Métodos de Estudo*

Usaram-se no presente trabalho, embriões colhidos em exemplares sadios de *Euphorbia pulcherrima*, situados a pequena distância do laboratório; os maiores foram cuidadosamente isolados do endosperma, ao passo que os menores eram deixados com pequeno revestimento dessa formação.

A mistura de Benda, com apenas 1 gota (ao invés de 2) de ácido acético glacial por 20 ml, foi empregada quase exclusivamente.

De três modos diversos operou-se a fixação:

1. Colocando o embrião diretamente na mistura;

2. Imergindo-o aí após tratamento prévio, por 20-24 horas, em solução nutritiva hipotônica;

3. Submetendo-o, antes, à cultura assética durante 7 a 10 dias.

O primeiro método não proporcionou resultados satisfatórios: por mais ràpidamente que se procurasse agir, parecia haver sempre perda importante de água, pois as células se apresentavam plasmolisadas; o segundo método, imaginado para obviar êsse inconveniente, correspondeu plenamente ao nosso desideratum. Quanto ao terceiro, permitiu observações do máximo interêsse e, estamos certos, ainda poderá fornecer dados relevantes em várias outras pesquisas sôbre o desenvolvimento e a diferenciação dos embriões.

A solução nutritiva recomendada pelo Departamento de Fisiologia da Escola de Agricultura da Universidade de Michigan, levemente modificada e diluída a 1/4, foi a que empregamos antes da fixação pelo 2.º método. Deve ser preparada a partir das soluções molares, nas quantidades seguintes (em mililitros): $K\ H_2\ PO_4$ — 1 ml; $K\ NO_3$ — 5 ml; $MgSO_4$ — 2 ml; $Ca\ (NO)_2$ — 5 ml. Acrescenta-se 1 ml de

cada solução suplementar (A e B) e completa-se o volume de 1000 ml. Na hora de usar, junta-se uma parte a três de água destilada.

Solução suplementar A: H_3BO_3 — 2,86 g: $Mn\,Cl_2 . 4H_2O$ — 1,81 g; $H_2\,Mo\,O_4$ — 0,02 g; $Zn\,Cl_2$ — 0,20 g; $Cu\,Cl_2$ — 0,05 g. Água destilada para completar 1000 ml.

Solução suplementar B: Tartarato férrico 5 g ‰ em água destilada. Depois de preparada a solução nutritiva, seu pH é de = 5,2.

Para se obter a cultura de embriões necessária ao 3.º método, tomaram-se cuidados especiais que nem sempre, porém, evitaram as contaminações. Os frutos eram lavados em água destilada e imersos em solução de hipoclorito (líquido de Dakin); na câmara assética, préviamente tratada pelos vapores de metanal, removidos, por sua vez, pelos de amoníaco, eram retiradas as sementes e extraídos delas, os embriões. A semeadura, em frascos "Erlenmeyer" contendo meio básico de White, acrescido de substâncias suplementares pelo segundo signatário do presente, era também realizada na referida câmara.

Em 1000 ml do referido meio havia — 100 ml da Sol. A, 10 ml da Sol. B, 22 g de agar e 20 g de sacarose, além das seguintes substâncias suplementares: 5 μg de vitamina H, 20 mg de ácido ascórbico, 0,5 mg de ácido nicotínico, 3 mg de glicina, 0,1 mg de riboflavina, 0,1 mg de cloridatro de tiamina, 0,1 de cloridrato de piridoxina, 0,5 mg de pantotenato de cálcio e 0,0002 mg de ácido B-naftoxiacético. *

Sol. A	
$Ca\,(NO_3)_2$	2,00g
$Mg\,SO_4$	3,60g
$K\,NO_3$	0,80g
$K\,Cl$	0,65
$Na_2\,SO_4$	2,00g
$Na\,H_2\,PO_4$	0,165g
$H_2\,O$	1000ml

Sol. B	
$K\,I$	0,075g
$Fe_2\,(SO_4)_3$	0,250g
$Mn\,(SO_4)_3$	0,450g
$Zn\,SO_4$	0,150g
$H_3\,BO_3$	0,150g
$H_2\,O$	1000ml

---

* H. Monteiro Neto pretende publicar uma nota a respeito da cultura de embriões.

Em resumo, foram os seguintes os embriões usados no presente trabalho, por ordem de designação:

Embriões cultivados durante 7 (A e B) ou 10 dias (C) — 3.º Método

A — comp. total 2,15 mm. cotilédones 1,15 mm.
B — comp. total 2,95 mm. cotilédones 1,55 mm.
C — comp. total 0,95 mm. cotilédones 0,35 mm.

Embriões fixados diretamente após dissecção — 1.º Método

G — comp. total 0,95 mm. cotilédones 0,50 mm.
T_1 — (c. transversais) — diâmetro na inserção cot. — 0,39 mm.

Embriões fixados após imersão por 24 horas em sol. nutritiva hipotônica — 2.º Método

H — comp. total 0,45 mm. cotilédones 0,15 mm.
I — comp. total 0,95 mm. cotilédones 0,45 mm.
L — comp. total 1,50 mm. cotilédones 0,75 mm.
M — comp. total 0,60 mm. cotilédones 0,28 mm.
N — comp. total 8,0 mm. cotilédones 4,50 mm. (quase maduro)
P — comp. total 0,54 mm. cotilédones ? (corte oblíquo)
S — comp. total 7,50 mm. cotilédones 4,30 mm. (quase maduro)
T_2 (c. transversais) — diâmetro na inserção cotil. — 1,2 mm.
T_{10} (c. " — " " " " — 0,52 mm.
T_{12} (c. " — " " " " — 1,0 mm.

Todas as mensurações foram feitas nos cortes já preparados, inclusive as dos embriões cultivados.

Os cortes foram efetuados com micrótomo rotativo de Spencer, em material incluído na parafina mediante a técnica usual do álcool etílico e xilol.

A maioria das lâminas foi colorida pela hematoxilina férrica, combinada ao verde dissolvido em óleo de cravo, ou a êste e à safranina. Alguns cortes foram submetidos à coloração de Feulgen, segundo De Tomasi (16).

Foi o material preparado pelo 2.º método que deu ensejo ao maior número das observações aqui relatadas e comentadas. Os embriões cultivados apresentaram caracteres comparáveis aos dêsse material: apenas, suas dimensões e particularmente os diâmetros do hipocótilo, eram maiores. Cotejados com os do 3.º método que mostravam o mesmo

comprimento total, poderiam, por êsse motivo, dar a falsa impressão de que haviam sofrido um retardamento da diferenciação. Quanto à marcha mesma deste processo, sòmente com novos e mais numerosos ensaios será possível um pronunciamento seguro. Desejamos, tão sòmente, nesta oportunidade, chamar a atenção para os seguintes fatos: nos embriões A e B pareceu-nos mais freqüente a formação de ramos a partir dos tubos procambiais e mais característico o ectoplasma parietal, fortemente corável pela hematoxilina férrica; no embrião C havia grande disparidade entre as dimensões externas e a fase da diferenciação, comparativamente aos embriões do 3.º grupo citado.

III — *Resultados*

Nas observações que ora serão expostas, não se fará descrição minuciosa do sistema laticífero do embrião, assunto já considerado pelos três autores muitas vêzes citados (2), (13) e (14) em espécies do mesmo gênero. Apenas mencionaremos os traços mais característicos do sistema, necessários à compreensão do que será dito sôbre a origem de suas partes componentes.

A formação se inicia ao nível da inserção dos cotildones, ou seja, no "plano nodal": aí aparecem as vesículas, a partir das quais surgem os tubos: freqüentemente há transição insensível dêstes para aquelas.

Os primeiros tubos assim originados caminham no referido plano, descrevendo arcos; os que provêm das diversas vesículas encontram-se, portanto, entrelaçam-se e contraem anastomoses em vários pontos, constituindo um verdadeiro plexo — o plexo nodal.

Logo após o comêço da formação dos "tubos nodais", principiam a diferenciar-se os "tubos cotiledonares", da base para o ápice.

Só muito mais tarde é que surgem os tubos do hipocótilo, a partir do plexo já então bem constituído. Os que primeiro se percebem, estão relacionados com o limite ex-

terno da região do procâmbio, situando-se seja nas margens dos cordões procambiais, seja no intervalo entre os mesmos; ulteriormente formam-se outros, localizados em pleno córtex. Só nos detivemos no estudo dos primeiros *(innern Schläuche* de SCHMALHAUSEN, *tubes centraux* de CHAUVEAUD*)* que chamàmos *procambiais* pelos motivos apontados: os *tubos corticais,* externos em relação aos primeiros, são menos importantes. Uns e outros se prolongam pela radícula, sendo que os *corticais* inflexionam-se, segundo CHAUVEAUD (2) para dentro, antes de atingirem êsse órgão.

De todos os tubos citados destacam-se ramos de calibre menor que percorrem diversos tecidos em direções várias, atingindo, freqüentemente, a camada epidérmica: êste é especialmente o caso dos cotilédones, onde os ramúsculos últimos, de calibre muito pequeno, constituem interessantíssimo retículo ou plexo, de que já falamos na introdução e tornaremos a falar oportunamente.

Vesículas

Dos embriões que estudamos, o menos diferenciado — *H* — já possuía dois cotilédones, de comprimento muito desigual, aliás, parecendo que o menor fôra tolhido em seu crescimento pelos tecidos vizinhos (Foto 1). É fora de dúvida que já ultrapassara a "fase em coração", clàssicamente apontada como aquela em que se diferenciam as "iniciais". Estas, todavia, não eram visíveis nos cortes longitudinais examinados. Notamos, apenas, a ocorrência de raros elementos com 2 ou 3 núcleos que, no entanto, pelo tamanho e conteúdo quase não se distinguem dos demais. Sua localização no plano do futuro plexo nodal, fêz-nos supôr constitúíssem a primeira fase da formação das "vesículas". Assim, na foto 2, que reproduz com maior aumento um trecho da foto anterior, aparece assinalado um elemento dotado de dois núcleos que estão muito próximos um do outro. Anàlogamente, na foto 3, de um trecho de outro corte do mesmo embrião, está assinalado um elemento com três núcleos. Existem indícios, no citoplasma, de três protoplastas que se teriam fusionado.

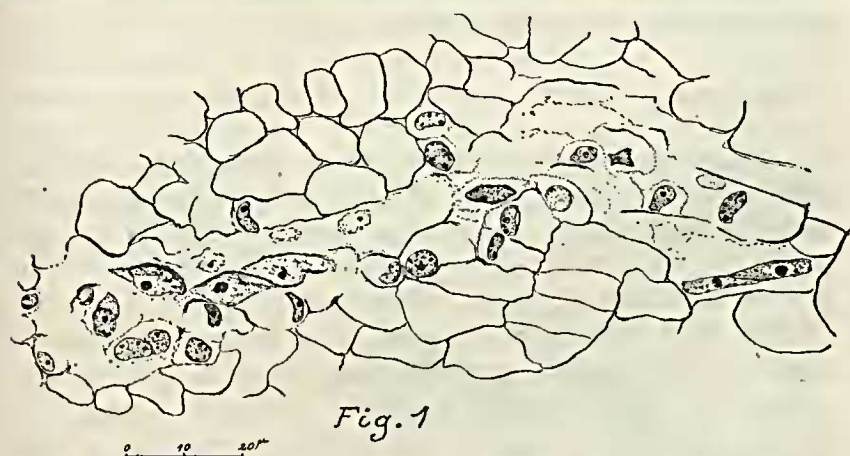
Consideramos necessárias novas pesquisas para o esclarecimento dessa fase primeira da diferenciação. Enquanto não forem elas realizadas, julgamos preferível a denominação de "focos" à de "iniciais" (V. Discussão e Conclusões).

É óbvio que na fase de desenvolvimento do embrião *H* ainda não há vesículas. Nos embriões cujo comprimento total excede a 0,5 mm, já se percebem geralmente com suficiente nitidez: seus diâmetros, maiores que os das células vizinhas, fazem-nas sobressair. Acreditamos que tenham elas sido tomadas por *"Iniciais"*, ou melhor, que hajam servido de modêlo a estas. Na verdade, os atributos apontados pelos autores antigos para as iniciais laticíferas ou seja, maior volume da célula e refringência especial, ora das paredes, ora do conteúdo, ajustam-se perfeitamente às vesículas pequenas.

No corte longitudinal do embrião *M*, que aparece na foto 4, há uma vesícula ainda pouco desenvolvida, mas distintamente visível. A verdadeira natureza dessas formações é aqui particularmente manifesta. Nas fotos 5 e 6, ampliações da anterior, percebe-se claramente que quase todas as células que limitam a vesícula em questão, abrem-se na sua cavidade. Isso significa que a mesma se originou da fusão de várias células, cujas paredes foram parcialmente dissolvidas.

Nas fases iniciais, nem sempre se distinguem tão nìtidamente as vesículas. No embrião *P*, menor e menos diferenciado que *M*, são elas alongadas e menos conspícuas. A foto 7 mostra na base do cotilédone, uma que se prolonga para dentro, onde irá formar o plexo nodal *(tubo nodal)* e para cima, constituindo aí o *tubo cotiledonar*. Na porção interna referida (assinalada) é fácil perceber três protoplastas fusionados. Os contornos de duas vesículas bem visíveis em outro corte do mesmo embrião, foram projetados e marcados a nanquim na fotomicrografia do corte imediato, distando 5 micra, portanto. Na cavidade da mais alongada, na realidade parcialmente subdividida (Foto 8), vêm-se 4 protoplastas, um dos quais ainda perfeitamente distinto.

O embrião *C*, medindo quase 1 mm apesar de pouco diferenciado, pelos motivos já expostos (Foto 9), mostra duas vesículas ainda em formação (nas fotos 10 e 11) as quais requerem especial atenção para serem vistas, não obstante estarem assinaladas. A da direita, V_1 é pequena e provida de dois núcleos alongados, tìpicamente diferenciados, que parecem prestes a se fundirem (fig 1); a outra, V_2, muito maior, deixa ver em seu interior vários protoplastas separados por vestígios de paredes e diversos núcleos. Alguns dêstes, em franca degenerescência, são muito volumosos e de contornos imprecisos: seu aspecto é muito semelhante ao dos núcleos vesiculosos (8). Outros, ainda, em diferentes fases de diferenciação, dispõem-se aos pares, como se devessem fundir-se ulteriormente (Fig. 1). Também no tubo de comunicação entre as 2 vesículas, há flagrantes fenômenos nucleares semelhantes aos mencionados: todos serão apreciados oportunamente.

Fig. 1

É nos embriões com cêrca de 1 mm de comprimento que as vesículas se apresentam mais nìtidamente. A foto 12 mostra-nos 4 vesículas multinucleadas, num corte longitudinal do embrião *I*. A maior, da direita, aparece muito ampliada na foto 13: sua forma geral oblonga, de maior diâmetro radial oblíquo, permite que se caracterizem 2 polos: um, interno, superior; outro, externo, inferior. Acima e

para dentro do primeiro, vê-se pequena vesícula, imperceptível na foto anterior. Sua cavidade está parcialmente subdividida por vestígios de paredes que atestam sua origem pluricelular; está ela sendo atingida pela extremidade ou polo *interno da vesícula maior, à qual se fundirá. O polo* externo desta última possue limites imprecisos: vestígios de *membranas celul*ares são aqui perceptíveis, denunciando fusão de protoplastas acompanhada, em diversos casos, de fusões nucleares (assinaladas). À direita e acima da vesícula maior, observa-se uma outra, parcialmente subdividida, que se prolonga, para cima, pelo ramo cotiledonar. É aqui particularmente visível a dissolução parcial da membrana separadora: esta mesma destruição localizada de paredes pode ser vista nos limites de todas as outras vesículas, tal como o foi no embrião *M*. Devemos, assim, nos convencer de que não sòmente a origem das vesículas, mas também, o crescimento ulterior das massas, estão na dependência da fusão de protoplastas. Na foto 13, merece *ainda menção o* desenvolvimento do plastidoma das vesículas.

Plexo nodal

Se nos cortes longitudinais dos embriões despertam-nos especialmente a atenção, as vesículas, nos transversais é, em geral, o plexo que se nos afigura mais importante: aquelas passam a representar meras dilatações e pontos de convergência dos tubos do plexo. Resulta êste último, aparentemente, da tendência dos "focos" a se unirem: estende-se, assim, a diferenciação laticífera pelo plano de inserção dos cotilédones (plano nodal) mediante tubos (*t. nodais*) de trajeto variável; propaga-se a seguir, aos cotilédones e, mais tarde, em direção à radícula.

Na espécie estudada, os "focos" e, portanto, as vesículas primitivas que deles resultam, são em número de seis, situados entre os cordões procambiais de igual número; quanto ao tamanho e forma dessas vesículas, em um momento dado, acreditamos que dependem das circunstâncias especiais do desenvolvimento de cada embrião.

No embrião *I*, com cêrca de 1 mm de comprimento total, as vesículas apresentam forma alongada, radial-oblíqua, como já foi dito.

A foto 14 deixa ver um corte mediano do mesmo embrião, no *qual se observa uma vesícula primitiva, típica*, na base de cada cotilédone: a forma alongada e a orientação oblíqua são perfeitamente características. Percebe-se, então, que o polo interno está situado na base do promeristema terminal embrionário, responsável pelo alongamento das vesículas.

Dito alongamento se processa, ainda uma vez, mediante fusão com protoplastas da base do referido promeristema, tal como no caso dos tubos laticíferos da planta adulta de *E. phosphorea* Mart. (7). A foto 15 mostra, com maior aumento, a vesícula situada à direita na foto anterior: a evidência do que foi dito ressalta do próprio aspecto estrutural. Assinale-se que em conseqüência do referido crescimento, localizado no polo interno da vesícula, esta se apresenta adelgaçada na metade superior; pode-se, entretanto, perceber a anexação de um grupo (assinalado) de protoplastas já fusionados, que irá restaurar a forma geral vesicular. Convém notar, também, proplastídeos conspícuos em divisão. Outro caso igualmente expressivo é apresentado na foto 16, de outro corte do mesmo embrião *I*, e na fig 2.

Fig. 2

Também aqui se vêem os proplastídeos em divisão; não há limite nítido entre o polo interno da vesícula e o promeristema.

Admitindo-se que as seis vesículas primitivas apresentem a mesma forma e disposição descritas, serão elas observadas com nitidez em um corte transversal executado mais ou menos à mesma distância vertical dos seus dois polos. É muito difícil obter tal corte nos embriões pouco desenvolvidos, que mais importam. A foto 17, de um corte apenas aproximado do ideal descrito (Embr. T_1), deixa ver apenas quatro das seis vesículas, por orientação defeituosa (assinaladas).

As ligações entre as vesículas, no plexo, ocorrem próximo dos planos correspondentes aos seus dois polos: pouco abaixo do inferior, onde se situam os polos externos, os tubos nodais contornam os cordões procambiais pela face externa (V. foto 18), ao passo que logo acima do superior, correlativo dos polos internos, ladeiam-nos internamente (V. foto 19). Se acrescentarmos a êsse esbôço as vesículas secundárias e os numerosos ramos nodais de várias direções, que se formam durante o desenvolvimento, estaremos em condições de compreender a complicação do referido plexo no embrião maduro, onde ocupa, na verdade, tôda uma região e não apenas um plano.

Em suma, compreende êle, de baixo para cima: anel laticífero inferior, constituído de ramos mais ou menos horizontais, dispostos em arco, limitando externa e radialmente os cordões procambiais; zona intermediária, abrangendo as vesículas primárias e secundárias, além de ramos comunicantes de direção variável, mas predominantemente semelhante à das vesículas (radial oblíqua); anel laticífero superior, perimedular, também constituído de ramos aproximadamente horizontais. Êste último anel, situado na base do promeristema terminal do embrião, irá fornecer os ramos do epicótilo.

No que tange à formação e ao crescimento dos tubos nodais, teremos que repetir o que vimos monòto-

namente afirmando: processam-se mediante fusão de protoplastas. Já nas fotos 7 e 11 pudemos observar as fases iniciais do desenvolvimento: na primeira foto, vimos três protoplastas (assinalados com seta) em processo de fusão; na segunda, percebemos claramente a origem multicelular do tubo comunicante entre as duas vesículas V_1 e V_2 (Fig. 1). No embrião quase maduro T_2 de que provêm os cortes transversais das fotos 18, 19 e 20 ressaltam ainda os mesmos fenômenos. Na foto 18, obtida pouco acima do anel laticífero inferior e oblìquamente ao respectivo plano, estão assinaladas porções de cinco vesículas primitivas (V_1, V_2, V_3, V_4 e V_5); nos tubos nodais externos e nos radiais, observam-se freqüentemente restos de paredes e vestígios dos protoplastas que se fundiram. Na foto 20 focaliza-se, com aumento maior, o feixe procambial situado abaixo de V_4; tanto nesta, quanto nas vesículas secundárias (V. S), vêem-se nìtidamente as peculiaridades apontadas. Nas séries de protoplastas assinalados em S_1 e S_2, os limites respectivos já desapareceram na primeira e apenas se entreveem na segunda: uma e outra contribuem para formação do tubo nodal assinalado em T_1 o qual, por intermédio de S_3 irá fundir-se à vesícula secundária V. $S._1$. Outro ramo que entrará logo em comunicação com a vesícula secundária próxima V. $S._2$, é o assinalado com T_2.

O exame das fotomicrografias 18, 19 e 20, sugere a ocorrência de anastomoses e fusões entre os tubos nodais, que assim constituiriam um verdadeiro plexo, no sentido anatômico mais comum. Esta era a concepção de SCHMALHAUSEN, rejeitada ulteriormente por SCHULLERUS (14) e CHAUVEAUD (2), como já foi referido.

Mais expressiva, ainda, a êsse respeito, é a foto 20-A, colhida em plano próximo ao do limite superior do plexo, onde se constitui o anel perimedular. Trata-se do embrião T_{10}, e o aspecto obtido, semelhante ao de campo escuro, deve-se ao emprêgo da objetiva Ph 16 x simultâneamente com o condensador de fase correspondente à obje-

tiva Ph 100 x. Nesta foto, onde só aparecem as paredes, percebe-se sua descontinuidade nos pontos de anastomose, bem como sua dissolução parcial em vários outros. A foto 20-B resultou da inversão de imagem semelhante à 20-A, obtida com dispositivo "Varicolor" em foco diferente. Aqui ressalta a natureza pluricelular de certos tubos nodais.

Tubos cotiledonares

Originam-se precocemente êstes tubos, ao mesmo tempo que os nodais ou logo após. No embrião *P* sua formação estava em comêço. Assim, na foto 7 já considerada em relação aos tubos nodais, há protoplastas dispostos em fileira simples, mais ou menos completamente fusionados, que representam o primeiro esbôço de um tubo cotiledonar (assinalado *t.c.)*. A fig. 3 reproduz o mesmo tubo, mostrando mais minuciosamente os respectivos protoplastas.

Fig.3

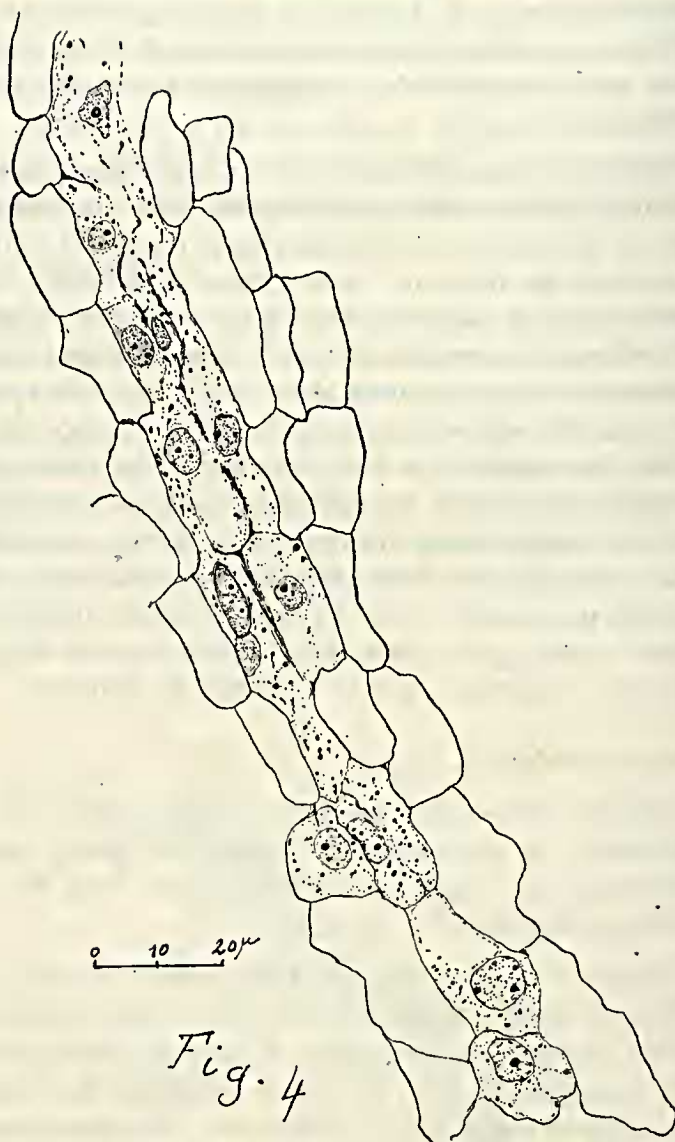
É ainda uma fileira de protoplastas fusionados que se observa na foto 21, obtida em corte longitudinal de um cotilédone do embrião *G*, próximo da sua extremidade. Ve-

êm-se nìtidamente os limites de alguns protoplastas; em tôrno dos respectivos núcleos ressaltam, na fotografia conseguida com dispositivo de "contraste de fase", proplastídios amilíferos.

Durante o desenvolvimento do embrião, não sòmente se constituem outros tubos cotiledonares, além dos principais de que já tratamos, como também êstes mesmos se alongam e aumentam de diâmetro. Esta última modalidade de crescimento é devida essencialmente à incorporação de elementos vizinhos aos ramos, tal como foi observado para os tubos caulinares de *E. phosphorea* Mart. (7). No corte transversal da foto 22, veêm-se os tubos cotiledonares por fora dos cordões procambiais. É fácil verificar, pelo exame atento da seção dêsses tubos, a anexação de células vizinhas, havendo, em vários casos, vestígios das paredes separadoras. O caso expressivo do tubo assinalado na foto 22, é melhor apreciado na seguinte, onde êle aparece muito ampliado. Verifica-se, então, que o referido tubo está cercado de células das quais o separam, apenas, vestígios de paredes.

Tubos procambiais

Surgem êstes tubos a partir do plexo nodal ou, mais exatamente, de suas vesículas, mas só se podem observar com nitidez, em geral, nos embriões com cêrca de 1 mm. de comprimento total.

Segundo a teoria clássica, êsses tubos, tal como os cotiledonares, seriam simples prolongamento das inciais, enviados aos espaços intercelulares. É curioso notar que o aspecto observado na Foto 24 parece confirmar êsse ponto de vista, estando assinalado o mencionado prolongamento. Na verdade, porém, a foto 25, colhida no corte imediato, à distância de 6 *micra*, demonstra a falácia da interpretação mencionada. Para melhor exame da porção terminal do tubo consultem-se a foto 26 e a fig. 4. Na primeira, obtida com aumento mais forte, estão assinalados: um núcleo, tìpicamente diferenciado, prestes a fundir-se com outro, situado

logo abaixo; uma célula, disposta na direção do provável trajeto do tubo, que se apresenta no início de clivagem longitudinal. Um e outra aparecem mais nìtidamente na figura 4. Esta nos sugere, ainda, a freqüência da divisão longitudinal dos elementos que concorrem para a formação do tubo. É de notar-se, também, o desenvolvimento do plas-

tidoma, especialmente na porção superior ou mais diferenciada do tubo e nas vesículas.

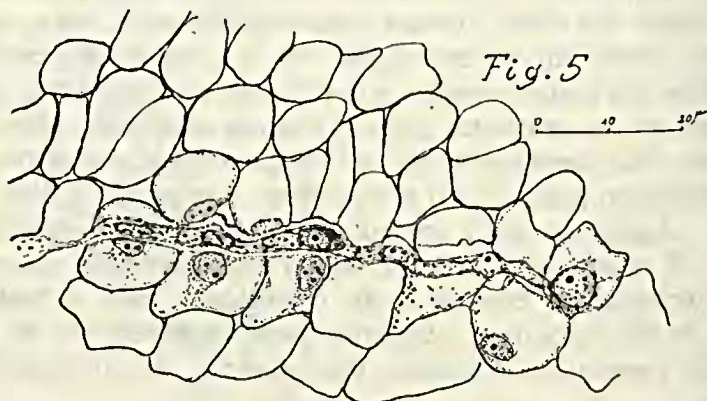
É claro que no mencionado tubo, constituído pela fusão de células (às vêzes clivadas longitudinalmente), seria, mais tarde, muito difícil caracterizar-se a origem pluricelular, máxime em cortes espessos e destituídos de conteúdos, como os que foram utilizados pelos primeiros estudiosos dêsse assunto. Nas preparações finais, obtidas com material fixado, é entretanto possível, em certos casos, comprovar a dita origem. Assim, no tubo procambial do embrião *A*, visível na foto 27, o simples contôrno, aqui particularmente marcado pelo ectoplasma colorido, com intensidade, pela hematoxilina de Heidenhain, é suficiente para convencer-nos de que vários elementos alongados participaram da formação do tubo.

Ramos laticíferos

Dos tubos oriundos das vesículas, alguns dos quais já examinados separadamente, a diferenciação laticífera se propaga mediante ramificações que, por sua vez, também se podem ramificar uma ou mais vêzes. Ao mesmo passo decresce progressivamente o calibre dos ramos que, em pouco, apresentam diâmetro muito menor que o das células vizinhas. Êsse fato é particularmente nítido nos ramúsculos que constituem o retículo subepidérmico (Vide foto 33).

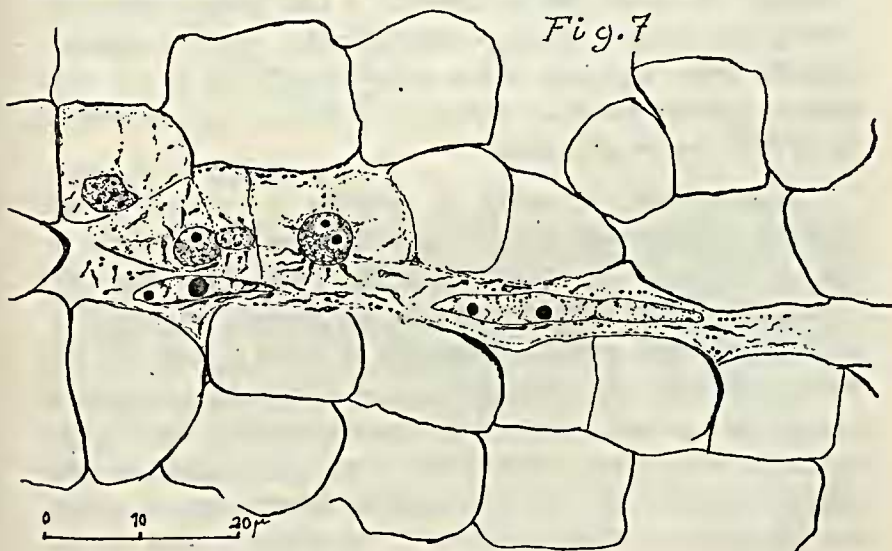
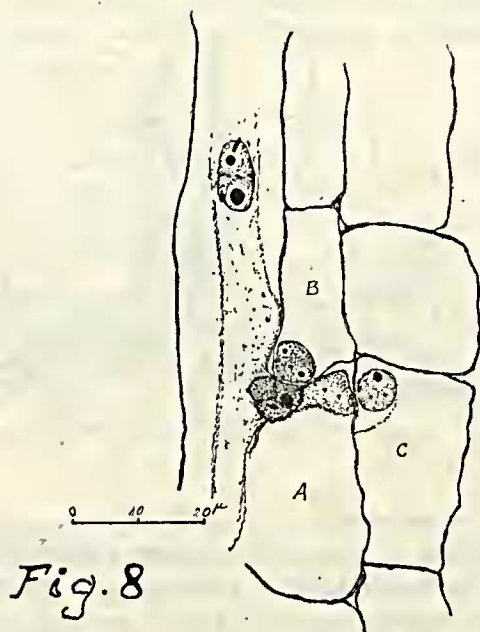
Parece-nos evidente que tais ramos finos muito contribuiram para a aceitação do ponto de vista de SCHMALHAUSEN que os comparou às hifas de um fungo parasita. Com efeito, por um lado custava admitir que êsses ramos proviessem da fusão de células, quando as demais, no campo microscópico, eram muito maiores; por outro lado, nesse caso, pelo menos, era compreensível que penetrassem nos espaços intercelulares.

A verdade, entretanto, é muito outra. Sòmente o exame de cortes finos do material fixado e convenientemente colorido, pôde elucidar o processo formador. Trata-se ainda aqui, de fusão; apenas, ao invés de se fundirem protoplastas inteiros, como é freqüente nos tubos mais grossos, são simples segmentos celulares que se unem, extremo a extremo.

Fenômeno análogo já foi por um de nós observado na formação dos ramos laticíferos do caule de *Euphorbia phosphorea* Mart. (9).

Caso plenamente ilustrativo, encontrado na base de um dos cotilédones do embrião *A*, aparece na foto 28 e na fig. 5. A partir de um laticífero (assinalado com L) forma-se fino ramo constituído pela fusão de segmentos de protoplastas, três dos quais, pelo menos, perfeitamente visíveis. Em um deles, assinalado, há dois núcleos que parecem prestes a fundir-se. Na parte final, situada à direita, existe volumoso núcleo em uma célula que ainda não se dividiu. Tem-se, todavia, a impressão de que o referido núcleo já se acha influenciado pelo ramúsculo ao qual, provàvelmente, fornecerá um núcleo-filho, no segmento citoplasmático respectivo.

Ainda na parte basal do mesmo cotilédone, assiste-se, em outro campo microscópico, ao aparecimento de curta ramificação, relativamente grossa, formada, sem dúvida, à custa das metades de duas volumosas células vizinhas. (Foto 29 e fig. 6). O que avulta, entretanto, no caso em aprêço é a curiosíssima formação, constituída de numerosos núcleos e que será melhor apreciada oportunamente.

A foto 30 e a fig. 7 mostram curto ramo, relativamente delgado, que se está constituindo no hipocótilo do embrião *B*. Também neste exemplo há segmentos protoplasmáticos fundidos, sendo de assinalar que os mesmos ainda não se encontram inteiramente distintos dos protoplasmas de origem: podem, no entanto, ser individualizados pelos plastídios

alongados típicos, e pelos núcleos bem diferenciados. Êstes dois últimos, bastante longos, parecem ter resultado da fusão de outros, especialmente o maior, em cujo contôrno se nota vestígio dessa origem. Quanto aos proplastídios alongados, precursores dos plastídios onde terão origem os bastões de amilo, estarão sempre presentes nos embriões, a partir dessa fase de desenvolvimento, nos ramos de calibre não muito reduzido.

Igualmente visíveis são tais proplastídios na foto 32 e fig. 9 que apresentam curto ramo de um tubo procambial do mesmo embrião *B*. O núcleo volumoso, provàvelmente oriundo de fusões anteriores, ocupa uma porção, ainda mal limitada, de ampla célula cortical: a esta porção fundiu-se protoplasta cortical pequeno, completando o ramo incipiente; adiante deste, espaçosa célula do córtex dividiu-se em duas (provàvelmente sob sua influência) uma das quais apresenta os já referidos proplastídios.

Conseguimos, em corte do embrião *A*, observar o que deve ser considerado como a primeira fase da formação de um ramo lateral de tubo procambial (Foto 31 e Fig. 8). O laticífero (que não se encontra exatamente no plano focalizado na foto) inicia a formação de ramo à custa de segmento destacado do protoplasta A: o núcleo hipercromático aí existente, o qual, com tôda verossimilhança, resultou da fusão de um núcleo do laticífero com o do próprio protoplasta (ou com um dos seus núcleos-filhos), exerce visível atração sôbre o núcleo da célula B. Também parece atraído

o da célula C; o que se observa, porém, de mais interessante neste último elemento é a delimitação, em início, da porção de citoplasma que será incorporada ao mencionado ramo.

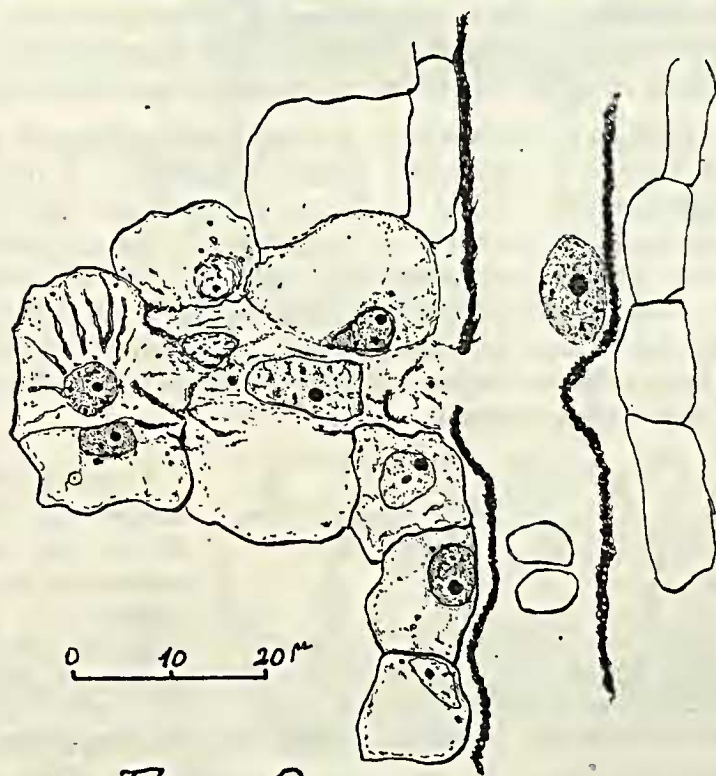



Fig. 9

Retículo subepidérmico

Em sua comunicação já tantas vêzes citada, deu SCHMALHAUSEN relêvo especial aos ramúsculos que se dirigem à epiderme, e ao retículo que os mesmos constituem. É esta, realmente, uma curiosíssima formação que lembra a rede capilar de certos tecidos animais. O diâmetro dêsses ramos é freqüentemente de 3 *micra*, reduzindo-se, em alguns trechos, a 2 *micra* ou menos: os núcleos são, naturalmente, também muito estreitos. A foto 33, obtida de um corte paradérmico de cotilédone do embrião *S* (já pràticamente maduro), algo oblíquo, mostra, no terço inferior, a subepiderme,

e nos 2/3 restantes, as células epidérmicas. Percebe-se que as malhas do retículo abrangem, via de regra, 3 a 5 destas células. Os proplastídios dos ramúsculos são quase todos esféricos, isto é, precursores de galactoplastídios. A simples inspeção da foto é suficiente para dirimir quaisquer dúvidas a respeito da realidade das anastomoses dêsses ramos.

Das mais surpreendentes (e sobremodo expressiva para nossa tese) é a origem dos ramos do retículo. A foto 34 permite-nos observar os primórdios do processo. No corte transversal do cotilédone do embrião *N*, quase maduro, veêm-se divisões periclíneas das células da epiderme dorsal e da camada subepidérmica (Vide Fig. 10): destacam-se, assim, segmentos protoplasmáticos, geralmente nucleados, que mais tarde se fundem longitudinalmente para constituir um ramúsculo laticífero.

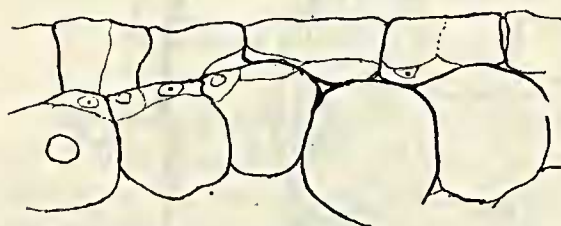



Fig. 10

A fusão já é perceptível na Foto 35, de um corte transversal do cotilédone do embrião *S*: o ramo que aí aparece sendo constituído mediante a fusão de dois segmentos de células paliçadiças, P e P., e de uma porção de célula epidérmica ventral. Nesta célula há dois núcleos ainda próximos, um dos quais, do futuro laticífero, já apresenta alongamento característico; assinalada, a linha oblíqua de clivagem do citoplasma.

Finalmente, a foto 36, de outro corte do mesmo cotilédone, mostra-nos um ramo de ordem imediatamente superior à dos ramúsculos, constituído, ao nível da paliçada, por segmento longitudinal, visìvelmente destacado da célula *P*; está êle em conexão com um ramúsculo, formado de segmentos basais de várias células epidérmicas, e que termina em um elemento, assinalado com seta, cuja porção interna, dotada de núcleo próprio, ainda não se isolou completamente do citoplasma restante. (Vide figura 11, semiesquemática).

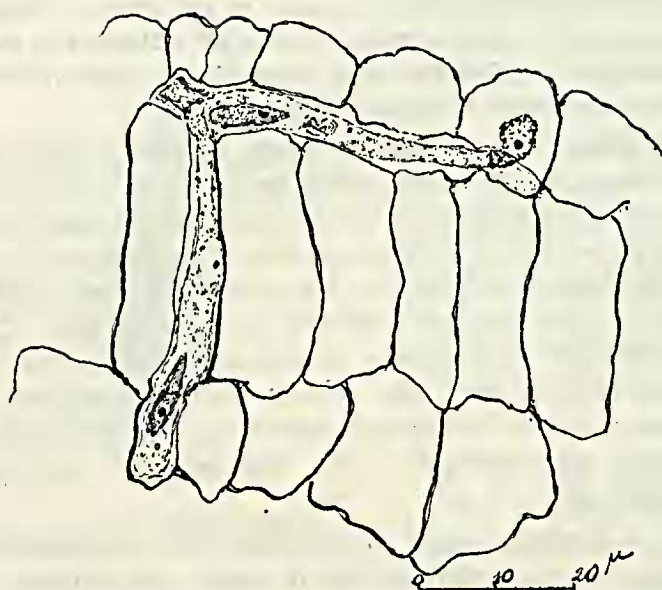



Fig. 11

A conclusão a tirar dessas observações é a de que o retículo, quanto à origem, deve ser comparado a uma colcha de retalhos, pois se compõe de porções provenientes de várias células epidérmicas e subepidérmicas.

Fenômenos nucleares

A importância das modificações dos núcleos dos laticíferos foi posta em relêvo pelo primeiro signatário, nos diversos trabalhos por êle publicados, um dos quais teve, justamente, por assunto as ditas alterações, na diferenciação dos tubos da planta adulta de outra espécie de *Euphorbia* (8). Concluiu, então, entre outras cousas, pela ocorrência constante de transformações características que ora constituíam u'a espécie de *cariorrexis,* ou seja, perda progressiva de cromatina, ora se assemelhavam a uma forma de picnose. As primeiras eram próprias dos *núcleos pioneiros*, pertencentes aos elementos primitivos dos tubos, ao passo que as últimas eram freqüentes nos *adventícios*, de protoplastas que

subseqüentemente se fundiam àqueles elementos. Negava-se ainda, nas conclusões, a possibilidade de mitoses nos elementos laticíferos *já diferenciados* e sugeria-se, como muito provável, a existência de fusões nucleares.

Estávamos longe de supor, então, que fatos análogos fôssem observados de modo ainda mais característico no embrião, de vez que tais alterações se avizinham sensìvelmente das que ocorrem em certos quadros degenerativos.

Nas páginas anteriores, temos repetidamente chamado a atenção para os fatos nucleares da diferenciação. Dentre êsses destacam-se a fusão e as alterações estruturais e cromáticas dos núcleos. São evidentemente fenômenos inter-relacionados e, talvez, interdependentes, mas podem ser considerados, na exposição, como dois aspectos distintos da diferenciação.

1 — A fusão parece constituir-se em manifestação precoce dos elementos produtores de latex: há indícios, como vimos (foto 2) de sua ocorrência nos próprios focos laticíferos do embrião *H*. Também na vesícula *1* do embrião *C* (foto 11 e Fig. 1) encontramos dois núcleos acolados; anàlogamente, em uma vesícula do embrião *I* (foto 13) já mostramos o mesmo fato, com dois grupos de núcleos; neste último caso ainda há que considerar a fusão simultânea de protoplastas.

Oportunidade para freqüentes fusões é ensejada pela formação de ramificações. Já o afirmáramos em trabalho anterior (9) sôbre os ramos laticíferos da planta adulta de *Euphorbia phosphorea* M. e hoje o repetimos com referência ao embrião de *E. pulcherrima*. Exemplos foram mostrados nas fotos 28, 29 e 31. Na segunda citada (V. também fig. 6), merece destaque o fato de se fundirem, aliás incompletamente, vários núcleos e não apenas dois. É fácil verificar a perda localizada de substância cromática, especialmente em tôrno a um dos nucléolos. Caso análogo, de diversos núcleos aglomerados, observa-se na foto 37 (Fig. 12): aqui as alterações parecem incidir principalmente nos nucléolos, dois dos quais apresentam região central descorada, ao passo que um terceiro dá-nos a impressão de que está sendo expulso do respectivo núcleo.

Fig. 12

Nos dois casos focalizados, há, portanto, núcleos volumosos — já provenientes de fusões anteriores — incompletamente fundidos em um todo que se poderia denominar *"sincarionte"*, no sentido puramente descritivo de FONT QUER (5) "Nucleo multiple, originado por confusion de varios nucleos simples".

Do mesmo embrião I provêm os cortes longitudinais oblíquos das fotos 37, 38, 39 e 40: em tôdas se observam com nitidez vários fatos dignos de menção. Na primeira, além do que já se disse convém chamar a atenção para a dissolução das paredes das células que vão constituir os tubos e ramos nodais, bem como para a multi-

Fig. 13

plicação de seus proplastídios (galactoplastídios). Na seguinte e respectiva fig. 13 há que considerar, além da lise das paredes, numerosas fusões de núcleos ainda muito jovens e pequenos, aos pares, e um núcleo gigante, hipocromático, sem contôrno nítido. Muito sugestivo é o aspecto da foto 39: um núcleo já tìpicamente diferenciado apresenta forma peculiar, encurvando-se na direção de um segundo, pouco modificado, ao qual provàvelmente irá fundir-se: o encurvamento do primeiro núcleo, a conformação especial da sua extremidade, que parece já preparada para fusão e a alteração da parede celular, cujos vestígios ainda se percebem entre ambos, conferem ao fenômeno, no caso particular, as aparências de verdadeira conjugação. Parece-nos lícito concluir, portanto, que os núcleos não se fundem apenas porque fortuitamente se acham próximos, mas devido à existência, pelo menos entre certos núcleos simples, de real atração.

Embora diminuída, parece persistir a dita atração mesmo entre os núcleos grandes, resultantes de fusões anteriores. É o que se depreende dos aspectos assinalados no tubo nodal da foto 40: em *1*, dois núcleos múltiplos já estão acolados e ainda parecem atrair um terceiro, jovem e cromático; em *2*, o núcleo múltiplo deve estar exercendo atração sôbre um núcleo próximo, a julgar pela forma deste último.

A presença de núcleos gigantes, múltiplos, é, pois, freqüente nos laticíferos embrionários; nos que constituem o "plexo nodal", entretanto, a referida presença é constante e característica. Nos cortes transversais que compreendem o citado plexo, tais núcleos ferem logo a atenção do observador, particularmente nas primeiras fases do desenvolvimento, quando são mais numerosos. As fotos 40A e 40B mostram cortes transversais através do plexo do embrião T_1. Êste foi fixado diretamente, razão porque se observa acentuada plasmólise. Seu diâmetro na base dos cotilédones correspondia mais ou menos ao do embrião *G*, com pouco menos de 1 mm de comprimento total. As figuras 14 e 15 reproduzem os princiais tipos nucleares aí encontrados; são também visíveis, para confronto, os contornos de certos núcleos estranhos ao plexo. É impressionante a desproporção volumétrica observada entre os núcleos gigantes dos latici-

feros e os da células vizinhas. Aqueles, dotados de dois ou mais nucléolos, também muito volumosos, exibem, algumas vêzes, indícios seguros de fusões anteriores. É êste particularmente o caso dos dois núcleos assinalados nas fotos 40A e 40B, como bem se verifica nas figuras 14 e 15, cujos desenhos foram executados em câmara clara.

Fig. 14

2 — Das alterações nucleares a mais conspícua é a que se traduz pela diminuição progressiva da cromatofilia. Pouco perceptível inicialmente nas preparações microscópicas ordinárias, torna-se, mais tarde, visível nas lâminas coradas pela hematoxilina férrica, quando corretamente diferenciadas. Nas fotomicrografias já citadas, há uns

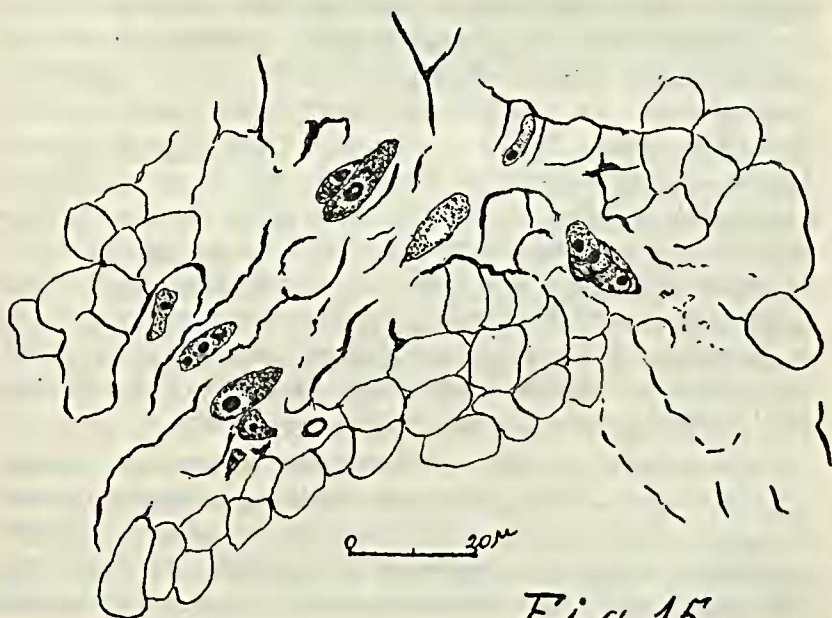



Fig. 15

poucos exemplos dêsses núcleos nìtidamente hipocromáticos. Assim, na foto 11, vêem-se dois, dêsse tipo, parecendo que se vão fundir, *V-1;* três outros, em franca degenerescência, com os contornos já imprecisos, apareem na V_2. Um núcleo gigante, também imprecisamente limitado, é visível na foto 38. Finalmente, na foto 40, podem ser observados na ponta da seta *1*, dois núcleos em processo de fusão, já bastante grandes, que em confronto com os demais, se mostram caracterìsticamente menos coloridos.

A explicação dêsses aspectos, que logo nos acudiu, foi a da evasão de ácido desoxi-ribonucleico. Para verificar o acêrto de nossa conjetura, colorimos várias preparações microscópicas pelo método de Feulgen, segundo De Tomasi (16). Pudemos, dêsse modo, certificar-nos de que os núcleos pioneiros dos laticíferos acabam por esvasiar-se, pràticamente, do referido ácido. A foto 41 mostra, assinalado com seta, um núcleo gigante nesse estado final.

Mais expressivos, porém, sob êsse aspecto, são os aspectos apresentados pelo plexo nodal. Na foto 42, colhida em certo trecho do plexo de T_{10}, vêem-se diversos núcleos gigantes, muito descoloridos, nas cavidades dos tubos. Para torná-los distintos, foi necessário usar a microscopia de fase; mesmo assim, alguns aparecem como simples "sombras" (assinalados). De grande importância para nossa interpretação é o aspecto fixado na foto 43. Emigrando do núcleo, deveria o ácido desoxi-ribonucleico difundir-se no citoplasma e aqui seria possível caracterizá-lo em determinadas circunstâncias. Na referida fotomicrografia vêem-se porções de citoplasma dos tubos que tomaram a coloração de Feulgen (assinalados). As fotos foram obtidas com filtro verde n.º 58 de Wratten. A observação cuidadosa, com maior aumento, revelou-nos em vários dêsses casos, os vestígios dos núcleos que, então, aparecem como regiões mais claras.

Finalmente, no plexo dos embriões mais desenvolvidos, como é o caso de T_{12}, além dos núcleos pioneiros, hipocromáticos, pouco visíveis nesse estádio, surgem os núcleos picnóticos, de que já tratamos a propósito de *Euphorbia phosphorea* (8). São êles menores e muito mais corados que os das células vizinhas aos tubos, sobressaindo, por isso,

nas fotomicrografias. Na última citada, já são êles visíveis, em alguns trechos, mas em número pequeno. Na foto 44, do embrião T_{12}, são mais abundantes e mais fàcilmente perceptíveis. É, porém, na foto 45, de um setor do mesmo campo, visto com maior aumento, que podem ser melhor apreciados (assinalados). No conteúdo dos tubos encontram-se, também grãos de amilo que aparecem brilhantes (microscopia de fase). Os referidos núcleos, observados com objetiva de imersão, revelam-se irregulares quanto à forma e constituição: em seu interior há freqüentemente soluções de continuidade, a denunciar um processo degenerativo.

IV — *Discussão e Conclusões*

Das investigações que realizamos resultou claramente que o sistema laticífero do embrião de *Euphorbia*, tal como o da planta adulta, provêm de sucessivas fusões de protoplastas. Êsse modo geral de formação tanto se aplica à origem das vesículas e dos tubos, como ao seu ulterior crescimento.

A propósito das primeiras, julgamos temerário, por enquanto, qualquer pronunciamento definitivo sôbre os primórdios do processo. É óbvio que o conceito de *inicial laticífera*, tal como o entendiam os autores citados (2), (13), (14) e (12), já não pode ser mantido.

Mas teriam visto, realmente, os mencionados autores, autênticas células iniciais? Quanto aos três primeiros, pelo menos, tudo faz crer que não. Os próprios recursos técnicos de que podiam lançar mão, sugerem resposta negativa. Vejamos como as caracterizam. SCHMALHAUSEN (13) à pg. 8, assim se expressa: "... liegende Zellen, welche zuerst duch ein besonderes Lichtbrechungsvermögen der Zellwände, welches dieselben aufgequollen erscheinen lässt, vor der umgebenden Zellen auszeichnen"; distinguiu-as, portanto, pela *refringência especial das paredes*. SCHULLERUS (14) após afirmar à pg. 36 que não conseguira embriões bastante jovens para observar as primeiras fases do desenvolvimento — "... und insbesondere nicht genug junge Samen von *Euphorbia Lathyris*, meinen eigentlichen Versuchsobjecte haben konnte, gelangt es mir nicht, die Entstehung jener

Schläuche aus einzelnen Zellen direct zu beobachten" — diz à pg. 54, que as células inciais se reconhecem pela *refringência peculiar do conteúdo,* como já observara SCHMALHAUSEN: "Wenn die Milchzellen an der Embryokugel erkennbar werden, so fallen sie durch das eigentümliche Lichtbrechungsvermögen ihres Inhaltes auf, ehe sie durch die Form von ihren Nachbarzellen auszeichen, was schon Schmalhausen beobachtet hat". Pensando concordar com êste Autor, êle, portanto, dá outra característica. Finalmente, CHAUVEAUD (2) à pg. 78, assim se reporta às iniciais: "Mais bientôt, des différences surviennent entre ces cellules. Certaines d'entre elles ayant acquis la taille à laquelle les autres se divisent par une cloison, ne se cloisonnent pas et continuent à s'accroitre, en même temps que leur contenu acquiert une réfringence plus grande que celle du contenu de leurs voisines". Êste Autor reconhecia, pois, as iniciais laticíferas pelo maior tamanho e conteúdo de refringência mais acentuada. Como se vê, critérios diferentes. Se tivermos em conta que quase todos os cortes eram despojados dos conteúdos celulares antes da observação, concluiremos que, na verdade, a forma diferente, o tamanho maior e, talvez, em certos casos, a marcada refringência das paredes, devem ter sido os caracteres de que se serviram os referidos Autores. Tais caracteres só se apreciam nìtidamente nas vesículas, razão porque declaramos a propósito destas formações, que as mesmas é que devem ter sido descritas como *iniciais.*

Interessante prova da precariedade do critério para distinguir as iniciais é a discordância entre os respectivos números, apontados por SCHMALHAUSEN (13) e CHAUVEAUD (2) para as espécies que ambos estudaram. Assim, em *E. peplus,* acharam, respectivamente, *4* e *8 iniciais;* em *E. lathyris, 8* e um círculo completo delas; em *E. myrsinites, 6* e mais de *30.*

Releva, ainda, considerar as questões seguintes. Admitindo-se o ponto de vista que expusemos sôbre a origem do sistema laticífero embrionário, será legítimo conservar-se o conceito de *inicial laticífera?* Em que medida? Se, por hipótese, dois ou três protoplastas de determinada região, se

fundirem para dar início à formação de uma vesícula, só a êsses deveremos reservar a denominação de iniciais? Ou, ao contrário, estendê-la àqueles que, logo a seguir, venham a unir-se aos primeiros? Ou, ainda, aos demais que tiverem o mesmo destino, durante todo o período da embriogênese?

São essas, sem dúvida, questões embaraçosas. Eis porque preferimos, por ora, usar a expressão "focos laticíferos": assim designamos as regiões do plano nodal, onde se localizam as primeiras células a apresentar diferenciação laticífera; aí, também se fundem os protoplastas, dando origem às vesículas.

RESUMO

As investigações do presente trabalho foram realizadas em quinze embriões de *Euphorbia pulcherrima* Willd., colhidos em diversas fases de desenvolvimento, a fim de verificar a teoria de SCHMALHAUSEN no próprio terreno que lhe serviu de base.

Obtiveram-se as melhores preparações fixando os embriões na mistura de Benda, após prévia imersão, durante 20 a 24 horas, em solução nutritiva hipotônica.

Das observações que efetuamos depreende-se que se inicia a formação do sistema laticífero ao nível do plano de inserção dos cotilédones (p. nodal), em regiões limitadas (geralmente seis na espécie estudada) que denominamos "focos". Aí parece ocorrer, desde logo, fusão de protoplastas e, talvez, de núcleos; consideramos necessárias novas pesquisas sôbre essa fase inicial do processo.

Mediante crescimento, que inclui a incorporação de novas células, transformam-se os focos em vesículas; estas, quando ainda pequenas, devem ter sido tomadas por *iniciais*.

Propaga-se, em seguida, a diferenciação laticífera no próprio plano nodal, através de tubos que descrevem arcos, encontram-se, entrecruzam-se e contraem anastomoses: assim se constitui o *plexo nodal*. Quase ao mesmo tempo, estende-se o processo aos cotilédones e, mais tarde, ao hipocótilo e à radícula. Surgem, pois, os tubos nodais, cotiledonares, procambiais e corticais.

A formação de todos êsses tubos, bem como, dos seus ramos, orientados em várias direções, resulta sempre da fusão de células ou de porções de protoplastas. É esta última modalidade que explica a origem dos tubos muito finos e, em particular, dos que constituem o *retículo sub-epidérmico*, descoberto por SCHMALHAUSEN nos cotilédones.

Como também o crescimento das vesículas e dos tubos, inclusive em diâmetro, se processa mediante incorporação de novos elementos que se fundem ao sincício laticífero, podemos afirmar ser a *fusão* o fato essencial da ontogênese dos tubos de *Euphorbia*, tal como o é dos tubos articulados.

Foram, ainda, apreciados alguns fenômenos citológicos ligados à diferenciação laticífera. Proplastídeos em multiplicação puderam ser vistos em várias oportunidades; assim, também, fusões nucleares muito freqüentes, que esclarecem a signifcação dos núcleos gigantes, encontrados ordinàriamente nos tubos, máxime do plexo nodal. Observaram-se alterações nucleares, semelhantes às já referidas para o caule de *E. phosphorea*, Mart. A perda progressiva de cromaticidade, conseqüente à evasão de ácido desoxi-ribonucleico *(cariorrexis)* é comum nos núcleos primitivos; nos embriões mais desenvolvidos, ocorrem igualmente núcleos picnóticos, especialmente no plexo.

ABSTRACT

This study was made to check the SCHMALHAUSEN'S theory on the same ground upon which it has been erected — the embryo of *Euphorbia* spp.

For the purpose of this investigation many embryos of *Euphorbia pulcherrima* Willd. have been collected at different development stages and fixed in Benda fluid; the best results were obtained when the material had been immersed in hypotonic nutritive solution during 20-24 hours, previously to the fixation.

The origin of the laticiferous system is ascribed to determined points or *focuses* in the nodal plane, which are distinguished by the occurrence of protoplast fusion and perhaps also of nuclear fusion (Foto 2-3).

Growing and incorporating with neighbouring protoplasts the *focuses* are changed to *vesicles* which have no trim boundary but, on the contrary, open to some bordering cells (Foto 4-18, 20, 24, 25); nevertheless they have been taken for *initial cells* by ancient authors.

From the *focuses* the laticiferous differentiation spread at the nodal plane, through the nodal tubes which constitute a true (anastomosing) plexus (Foto 18, 19, 20-A); the process attains the cotyledons, the hypocotyl and radicle through the *cotyledonary*, *procambial* and *cortical* tubes.

All tubes (*nodal* — Foto 7, 10, 11, 20; *cotyledonary* — Foto 7, 21; *procambial* — Foto 24-27) as well their branches are formed by the fusion of protoplasts or protoplast-segments; the latter give rise especially to very fine ramifications (Foto 28, 30, 31) as those described by SCHMALHAUSEN in the subepidermic net-work of cotyledons (Foto 33-36).

As the enlargement of vesicles and tubes of *Euphorbia* is also the result of protoplast fusion (Foto 6, 13, 15, 16, 22, 23) the latter must be considered so important a phenomenon as in articulate-tubes.

Very frequent nuclear fusions, particularly in nodal plexus, are believed to be responsible for the common occurrence of laticíferous giant nuclei (Foto 2, 11, 13, 26, 28, 29, 37-40).

Caryorhexis has been often observed in laticifers (Foto 13, 38, 39); sometimes there apparently is complete migration of DNA (Foto 41, 42) which diffuses into the cytoplasm (Foto 43); in the nodal plexus of more evolved embryos one can also see many picnotic nuclei (Foto 44, 45).

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit gründet sich auf die Untersuchungen an Embryonen von *Euphorbia pulcherrima* Willd. die wurden in verschiedener Phasen der Entwicklung ausgewählt, um Schmalhausens Theorie auf dem eigentlichen Gebiete, das ihm als Basis diente, nachzuprüfen.

Die besten Präparate wurden erreicht durch Fiexierung der Embryonen, die zuerst in hypotonischer Nährlösung 24 Stunden eingetaucht worden waren, in der Bendas Mischung.

Die Bildung der Milchsaftröhrenssystems beginnt an der Nodalebene, an Stellen (Zentren) zwischen den späteren Procambialsträngen: in jenen dürfte sich unmittelbar Protoplastenverschmelzung und vielleicht sogar Kernschmelzung vollziehen. Noch weitere Untersuchungen über den Anfang des Prozesse halten wir für notwendig.

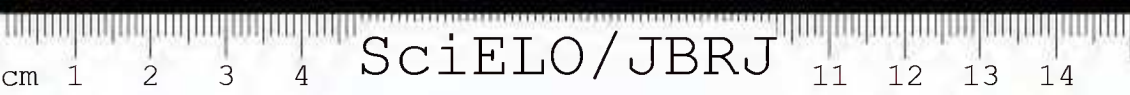
Durch die Entwicklung und Anschliessung anderer Zellen werden die Zentren zu Bläschen umgewandelt; solange diese sich in Anfangsstadium befanden, müssten sie als Schmalhausens Urzellen angesehen worden sein.

Von den Zentren aus verbreitet sich die Differenzierung der Milchsaftröhren in der Nodalebene durch die bogenbildenden Nodalröhren welche sich treffen, kreuzen und sich anastomosieren, wodurch der Nodalplexus entsteht (Photo 18-20A).

Fast gleichzeitig verbreitet sich der Prozess auf die Kotyledonen und später auf den Hypokotyl und das Würzelchen.

Alle Röhren, sowie ihre Verzweigungen entstehen durch Verschmelzung der Protoplasten oder Protoplastenteilchen (Photo: 7, 11, 20, 21, 26, 27). Diese können hauptsächlich in den feinen Verzweigungen beobachtet werden (Photo: 28-32), wie auch ganz besonders im von SCHMALHAUSEN unter der Kotylarepidermis entdeckten und bescrhiebenen Netz (Photo 33-36).

Da nun das Wachstum der Bläschen und Röhren, einschliesslich in Durchmesser (Photo 6, 13, 15, 16, 22, 23), erfolgt unter Anschliessung neuer Element an das milchenden Syncytium, können wir folgern dass die Fusion die Haupterscheinung bei der Ontogenesis von den Milchröhren in *Euphorbia*, ebenfalls (wie bekannt) bei den gegliederten Röhren ist.

Es wurden auch einige zytologishe Phänomen betrachtet wegen ihres Bezugs auf die Differenziation der Milchröhren. Proplastidien wären ihrer Vehrmerung konnten bei verschiedenen Gelegenheiten erkannt werden (Photo: 13,

15, 16, 26). Häufige Nuklearverschmelzungen (Photo: 11, 13, 28, 29, 37, 39 40) erklären die Bedeutung der Riesenkernen, die gewöhnlich in den Röhren, hauptsächlich in Nodalplexus vorkommen (Photo: 37, 38, 40, 40A, 40B, 41). Nuklearveränderungen boten sich uns dar, die ähnlich sind den bereits angeführten am Stengel der *Euphorbia phosphorea* Mart. (8) Die Karyorhexis eine Folge fortwärenden Verlustes der Desoxyribonukleinsäure, ist ganz allgemein in den primitiven Kernen (Photo: 11, 38, 41, 42, 43); in den entwickelteren Embryonen befinden sich ebenfalls pyknotische Kerne, besonders in Plexus (Photo 44).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 — ANÔNIMO — Die Milchsaftgefässe, ihr Ursprung und ihre Entwicklung *Bot. Zeit.* IV: 833-43; 849-59; 865-72 (1846).

2 — CHAUVEAUD, L.G. — Recherches embryogeniques sur l'appareil laticifère des Euphorbiacées, Urticacées, Apocynées et Asclepiadées — *Thése* — Fac. Sc. Paris (1891).

3 — DAVID, G. — Über die Milchzellen der Euphorbiaceen, Moreen, Apocyneen und Asclepiadeen — *Diss.* Breslau (1872).

4 — DIPPEL, L. — Entstehung den Milchsaftgefässe und deren Stellung in den Gefässbundelnsysteme der milchenden Gewächse — *Niewe Verhand. Bataafsch Genootschap* ... Rotterdam 1865).

5 — FONT QUER, P. — Diccionario de Botánica — Barcelona e Madrid (1953).

6 — HANSTEIN, I. — Die Milchsaftgefässe und die verwandten Organe der Rinde — Berlin (1864).

7 — MILANEZ, F.R. — Ontogênese dos laticíferos do caule de *Euphorbia phosphorea* Mart. — Arq. J. Bot. XII: 17-35 (1952).

8 — MILANEZ, F.R. — Sôbre os Núcleos dos Laticíferos de *Euphorbia phosphorea* Mart. — *Rodriguésia* XV (n.º 27): 163-175 (1952).

9 — MILANEZ, F.R. — Origem das ramificações dos laticíferos do caule de Euphorbia phosphorea Mart. — Arq. J. Bot. XIII: 95-113 (1954).

10 — MILANEZ, F.R. — "Sôbre os Laticíferos Foliares de *Ficus retusa*"" — *Rodriguésia XVI* e *XVII* — (n.ºs 28 e 29): 159-180 (1954).

11 — SCHACHT — Die sogenannten Milch-Gefässe der Euphorbiaceen u. s. w. sind Milchsaftführenden, nicht selten verzweigte Bast-zellen — *Bot. Zeitg.;* IX: 513-21 (1851).

12 — SCHAFFSTEIN, G. — Untersuchungen an ungegliederten Milchröhren — *B.B.C.* I, 49: 127-220 (1932).

13 — SCHMALHAUSEN, J. — Beiträge zur Kenntnis der Milchsaftbehälter der Pflanzen — *Mem. de l'Acad. d. Sc. de St. Petesbourg*. Ser. 7, T. 24; n.º 2 (1877).

14 — SCHULLERUS, F. — Über die physiologische Bedeutung des Milchsaftes von *Euphorbia Lathyris* — *Abh. Bot. Ver. d. Prov. Brandenburg* 24: 28-93 (1882).

15 — SCHULTZ, C.H. — Die Cyclose des Lebenssaftes in den Pflanzen — *Verh. d. Kais. Leopold-Carol. Akd. d. Naturforscher* XVIII Suppl. II: 1-355 (1841).

16 — TOMASI, J.A. DE — A new procedure for the Feulgen reaction; a preliminary note. *Stain Techn*. 11: 70 (1936).

17 — TRÉCUL — (Citado por Schmalhausen) — *Compt. Rend. Acad. Sc.* XLI, pg. 294 (1865).

18 — UNGER, F. — Ueber Krystallbildungen in Pflanzen — *Ann. d. Wiener Mus. d. Naturg.* pg. 1-11 (1840).

DESCRIÇÃO DAS ESTAMPAS

I. Embrião *H*

1. Corte Longitudinal mediano (ca. 82 x)
2. Mesmo corte, focalizando elemento com dois núcleos muito próximos, no plano nodal (ca 350 x)
3. Outro corte longitudinal do mesmo embrião: elementos com três núcleos, no plano nodal (ca 500 x)

II. Embrião *M*

4. Corte longitudinal paramediano (ca. 82 x)
5. Mesmo corte, mostrando vesícula pequena (ca. 360 x)
6. Idem, idem (ca. 700 x)

III. Embrião *P*

7. Corte long. na base de inserção do cotilédone (ca. 420 x); vesícula alongada que se continua insensivelmente, para dentro, com um tubo nodal cuja extremidade interna, assinalada, se constitui de três protoplastas de limites imprecisos; para cima, prolonga-se a vesícula pelo *tubo cotiledonar*, assinalado *t.c.*, formado de protoplastas fusionados (V. fig. 3)
8. Outro corte longitudinal na base do mesmo cotilédone (ca. 420 x); os contornos de duas vesículas, bem visíveis no corte imediato (5μ) foram marcados a nanquim; no interior de uma delas, vêem-se quatro protoplastas mais ou menos distintos.

IV. Embrião *C*

9. Corte long. mediano (ca. 78 x)
10. Mesmo corte, mostrando a posição das duas vesículas e do tubo nodal que as une (ca. 183 x)
11. Vesículas (assinaladas V_1 e V_2) e tubo, com maior aumento (ca. 470 x); núcleos fortemente alterados, vesiculosos, em V_2; fusões nucleares e dissolução das paredes das células. (V. fig. 1).

V. Embrião *I*

12. Corte long. paramediano (ca. 90 x); quatro vesículas primitivas visíveis.
13. Mesmo corte (ca. 540 x); a vesícula primitiva da direita, assinalada na foto anterior, é aqui focalizada: no seu interior estão assinalados núcleos em processo de fusão; à direita da mencionada vesícula, aparece outra, grande, sub-dividida, indicada por setas: note-se o desenvolvimento do plastidoma e a dissolução localizada das paredes.

VI. Embrião *I*

14. Corte long. mediano, deixando ver uma vesícula alongada na base de cada cotilédone (ca. 220 x)
15. Mesmo corte (ca. 560 x) focalizando a vesícula da direita, cujo crescimento ao nível do polo interno, à custa do promeristema terminal, é claramente visível; assinalado um grupo de protoplastas já diferenciados e fusionados, que está sendo incorporado pela vesícula.

VII.

16. Embrião *I* — Corte long. paramediano (ca. 540 x) mostrando outra vesícula que se encontra em ativo alongamento, ao nível do polo interno: não há demarcação nítida entre o dito polo e a base do promeristema. Proplastídios em multiplicação. (V. fig. 2)
17. Embrião T_1 — Corte transversal (ca. 240 x) passando, só em parte, entre os polos interno e externo das vesículas; destas últimas (primitivas) apenas 4 (dentre 6) estão visíveis e assinaladas *(v.)*.

VIII. Embrião T_2 (ca. 50 x)

18. Corte transv. ao nível do plano que corresponde aproximadamente aos polos externos das vesículas

(uma das quais não é visível), assinalados com V_1, V_2, V_3, V_4 e V_5.

19. Corte transv. um pouco acima dos polos internos das vesículas que, por isso mesmo, não são visíveis; observe-se o anel laticífero perimedular.

IX.

20. Setor da foto 18, que tem por centro o feixe procambial situado abaixo de V_4 (ca. 265 x)
VS — vesículas secundárias.
S_1, S_2 e S_3 — Séries de protoplastas laticíferos em processo de fusão;
T_1 — Tubo a que irão incorporar-se as séries acima;
VS_1 — Vesícula secundária que irá fundir-se ao mencionado tubo.
T_2 — Tubo laticífero em formação.
VS_2 — Vesícula secundária que se vai unir ao tubo T_2.

X. 20-A — Corte transv. Embrião T_{10} (ca. 145 x) Anel perimedular do plexo nodal, observado em campo escuro; objetiva Ph. 16 x e condensador de fase correspondente à objetiva Ph. 100 x.

XI. 20-B — Mesmo campo, foco diferente — ca. 185 x. Aspecto semelhante ao da foto anterior, obtido por R.D. Machado mediante dispositivo "Varicolor"; pelo uso de um negativo intermediário, conseguiu êste técnico, a quem agradeço, inverter a imagem.

XII.

21. Corte long.; base de cotilédone do Embrião G. Formação de laticífero mediante fusão de protoplastas, alguns dos quais ainda podem ser individualizados, observada em contraste de fase. (ca. 1000 x).

XIII. Embrião T_2.

22. Corte transv. das bases dos cotilédones (ca. 100 x). Vêem-se, seccionados, vários laticíferos que crescem em diâmetro.

23. Setor do campo microscópico da foto 22, em tôrno do laticífero aí assinalado; dissolução das paredes que separam êste dos protoplastas vizinhos que lhe serão incorporados (ca. 600 x).

XIV Embrião *I*.

24. Corte long. paramediano, mostrando algumas vesículas; a seta indica o que poderia ser interpretado

como prolongamento de uma vesícula, não compreendida no corte, em demanda dos espaços intercelulares (ca. 225 x).

25. Corte long. paramediano, imediato ao da foto 24; o suposto prolongamento é a secção incompleta de um tubo procambial (ca. 320 x).

XV. Embrião *I*

26. Setor do campo microscópico da foto anterior, compreendendo a extremidade do tubo. Assinalados, um núcleo laticífero típico e a clivagem incipiente de um protoplasta. (ca. 666 x)

XVI. Embrião *A*

27. Corte long. paramediano, mostrando um tubo procambial claramente pluricelular (ca. 300 x)

XVII. Embrião *A*

28. Corte long. da base de um cotilédone: segmentos de protoplastas se fundem, extremo a extremo, para constituir um fino ramo laticífero; a seta mostra dois núcleos que provàvelmente irão fundir-se (ca. 885 x).

29. Corte long. na base do mesmo cotilédone (ca. 695 x). Curto ramo, de diâmetro grande; assinalado um *sincarionte*, constituído de vários núcleos incompletamente fusionados (V. fig. 6).

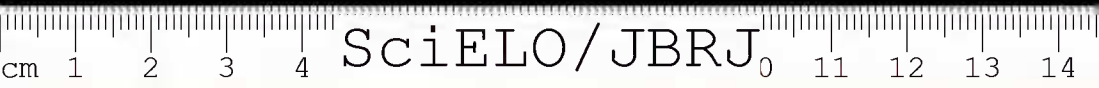
XVIII.

30. Trecho de um fino ramo que se está formando no hipocótilo do embrião *B*, à custa de segmentos ainda não inteiramente distintos dos protoplastas de origem (V. fig 7); núcleos típicos, longos e estreitos e proplastídios alongados (ca. 610 x)

31. Início da formação de um ramo lateral do tubo procambial, no hipotótilo do embrião *A* (ca. 615 x), à custa de porção da célula A (V. fig. 8); no citoplasma de C começa a surgir a demarcação do segmento pelo qual se prolongará o ramo.

32. Começo do desenvolvimento de ramo lateral de tubo procambial do embrião *B* (ca. 650 x); explicação no texto (V. fig. 9).

XIX.

33. Corte paradérmico de cotilédone do embrião *S* (ca. 680 x); retículo laticífero sub-epidérmico, constituído de ramos muito finos, anastomosados.

XX.

34. Corte transv. (ca. 1045 x) de cotilédone do embrião *N*, próximo à epiderme dorsal; algumas células epidérmicas e sub-epidérmicas sofrem divisão periclínea de que resultam segmentos de protoplastas; (confrontar com a figura 11, semiesquemática).

XXI. Embrião *S*

35. Corte transv. de cotilédone (ca. 1055 x): curto trecho de um ramúsculo constituído pela fusão de segmentos das células paliçádicas P e P' e de uma célula epidérmica, assinalada; nesta última vê-se a linha de separação do segmento de protoplasta que irá conrtbuir para o laticífero e percebem-se já dois núcleos (sendo um alongado e característico) provenientes da divisão do núcleo primitivo.

36. Corte transv. do mesmo cotilédone (ca. 640 x): o ramo *R* que visìvelmente se constitui de um segmento separado da célula paliçádica *P*, entra em conexão com um ramúsculo formado de segmentos basais de várias células epidérmicas; ver também a figura semiesquemática 11.

XXII. Embrião *I* (ca. 955 x).

37. Corte long. do hipocótilo, na região do plexo nodal: no trecho do tubo laticífero compreendido no plano do corte, vêem-se núcleos grandes, tìpicamente estruturados, mais ou menos ìntimamente unidos entre si (V. fig. 12); note-se a dissolução das paredes que separam o tubo de algumas células vizinhas.

38. Outro corte semelhante, na mesma região: núcleo gigante, hipocromático (N.G.) de limites difusos; em células vizinhas, mais ou menos confluentes, assinalados os núcleos que apresentam vestígios de fusões (F); confrontar Fig. 13.

XXIII. 39. Corte longitudinal do hipocótilo, interessando o plexo nodal do embrião *I* (ca. 815 x): assinalado um núcleo peculiarmente estruturado e conformado, dando a impressão de encurvar-se para fundir-se ao núcleo de uma célula vizinha; notar os vestígios da parede desta última.

XXIV. 40. Corte longitudinal do hipocótilo do embrião *I*, que atinge vesículas do plexo nodal; V_1, V_2 e V_3, parecendo dupla esta última. Entre V_2 e V_3 há um

tubo nodal de comunicação, onde estão assinalados núcleos gigantes: 1 — dois núcleos gigantes acolados, em processo de fusão que atingirá, provàvelmente, um terceiro núcleo, esférico, já muito próximo; 2 — núcleo gigante, cujo contôrno irregular sugere fusão anterior, parece atrair outro, piriforme. Em curto trecho. compreendido no corte, de outro tubo nodal está assinalado um quarto núcleo gigante. (ca. 520 x)

40-A e B. Corte transv. do embrião T_1, através do respectivo plexo nodal (ca. 540 x): muito visíveis os núcleos gigantes ainda bastante cromáticos. Estão assinalados aqueles que apresentam sinais inequívocos de fusões anteriores; confrontar com as figuras 14 e 15.

XXV. 41. Corte longitudinal do hipocótilo do embrião *L*, colorido pelo método de Feulgen, contrastado pelo verde rápido (ca. 795 x): no tubo laticífero vê-se um núcleo gigante pràticamente desprovido de ácido desoxi-ribonucleico (assinalado).

42. Corte transv. do embrião T_{10}, na região do plexo: colorido como o anterior e fotografado com dispositivo de contraste de fase (ca. 420 x). Além dos núcleos gigantes muito pobres em ácido desoxi-ribonucleico, mas ainda visíveis, outros há quase imperceptíveis, assinalados, que são meras "sombras nucleares".

XXVI. Cortes transversais na região do plexo nodal; coloração de Feulgen (ca. 170 x).

43. Embrião T_{10}, vendo-se que o citoplasma de alguns tubos (assinalados) apresenta reação positiva para o Feulgen.

44. Embrião T_{12}; fotografia com dispositivo de contraste fase.

XXVII. 45. Setor do campo microscópico da Foto 44, visto com maior aumento (ca. 577 x): ao lado dos núcleos comuns e de alguns hipocromáticos, pouco perceptíveis, aparecem muito nítidos os núcleos picnóticos, assinalados, e os grãos brilhantes de amilo (dispositivo de contraste de fase).

ESTAMPA I

ESTAMPA II

ESTAMPA III

9
10
V1
V2
11

12

13

14

15

16

17.

V1
V2
V3
V4
V5
18

19

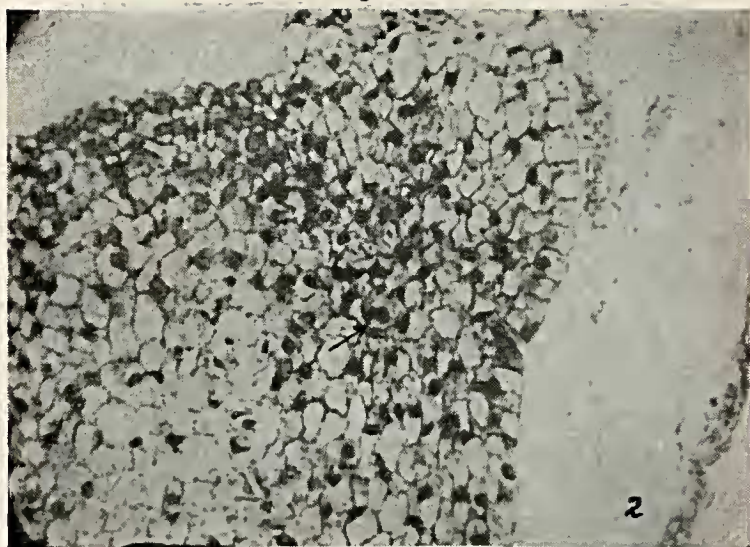
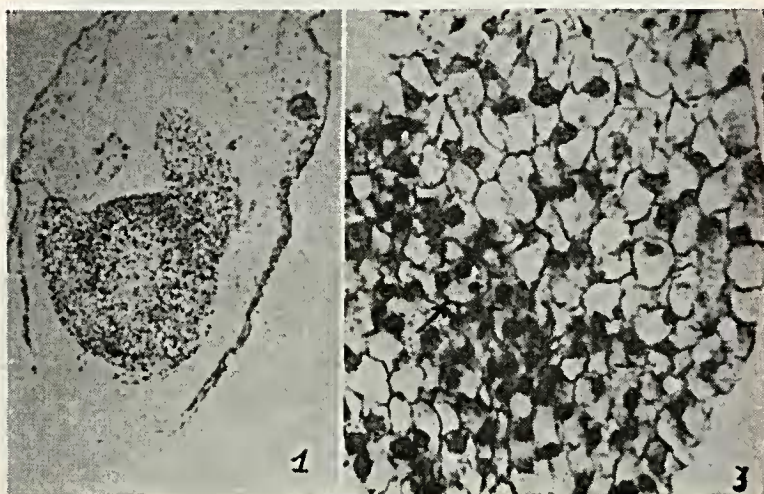
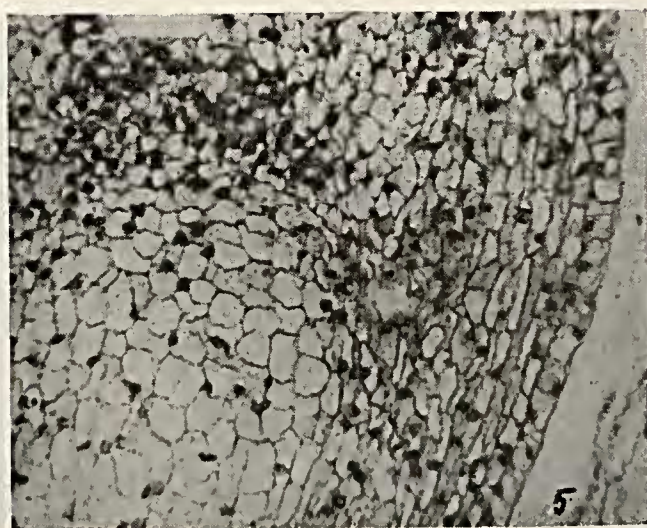
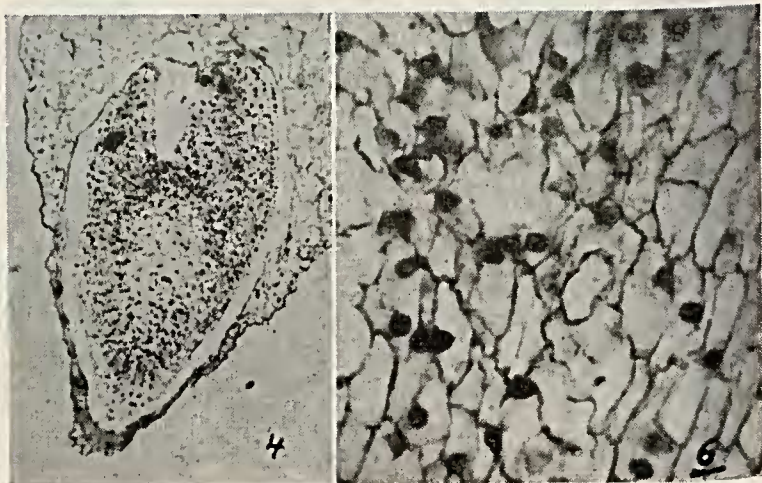
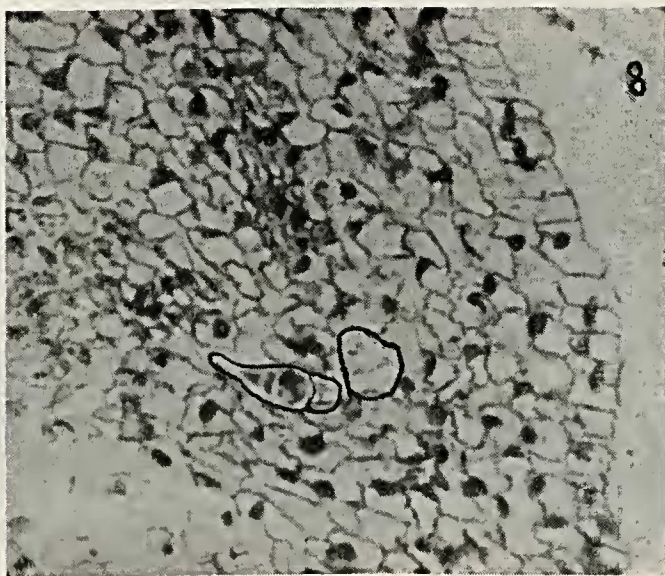
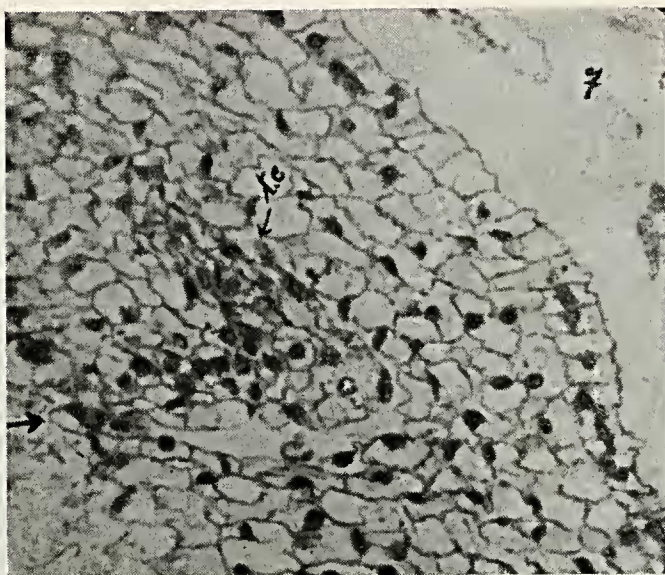
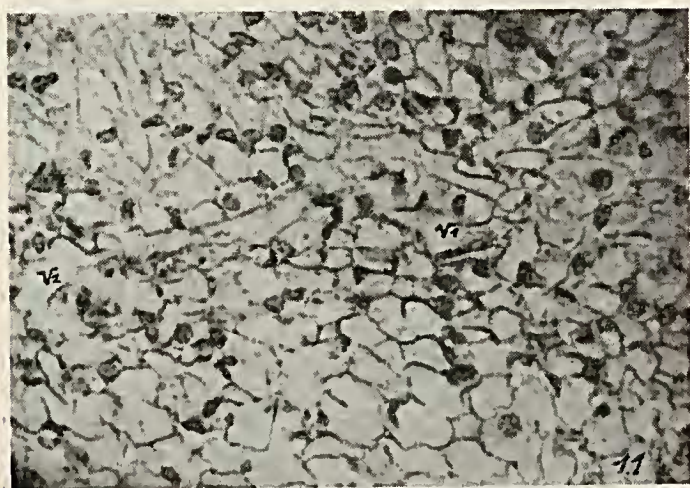
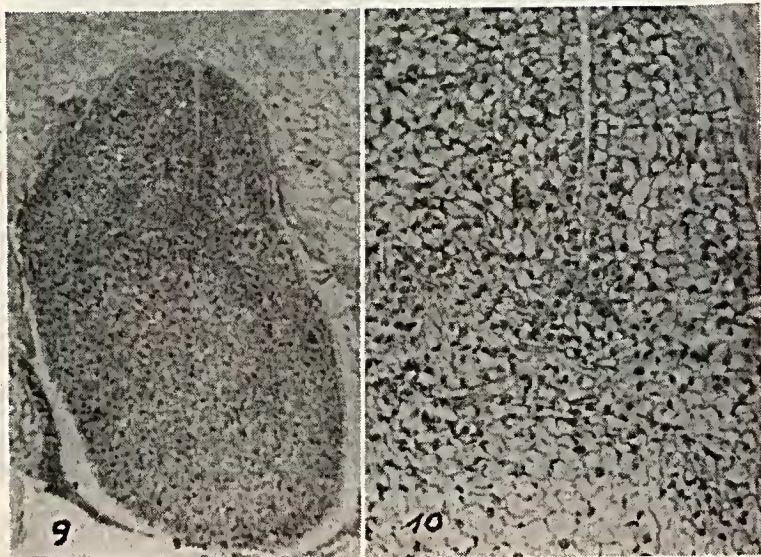
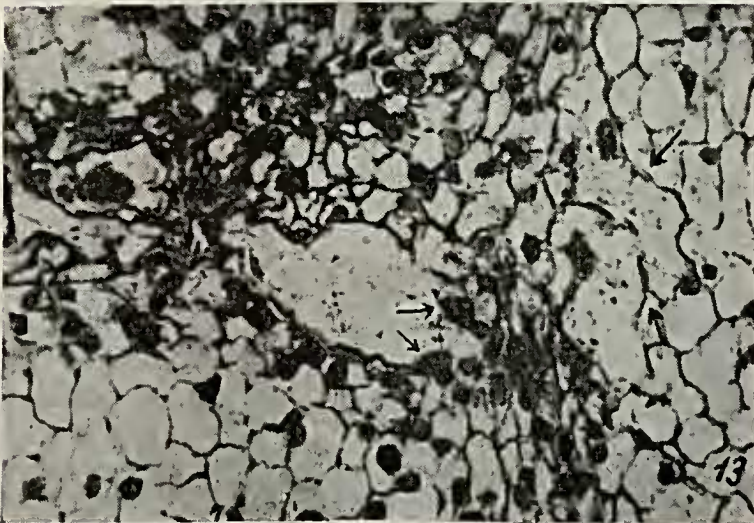
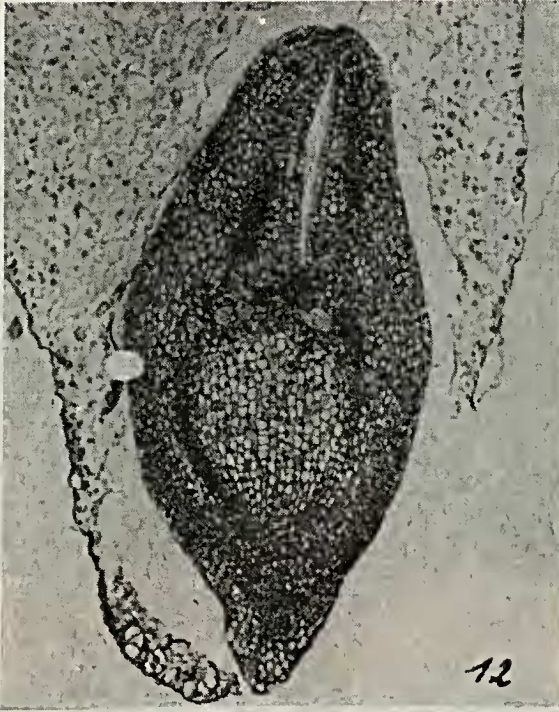
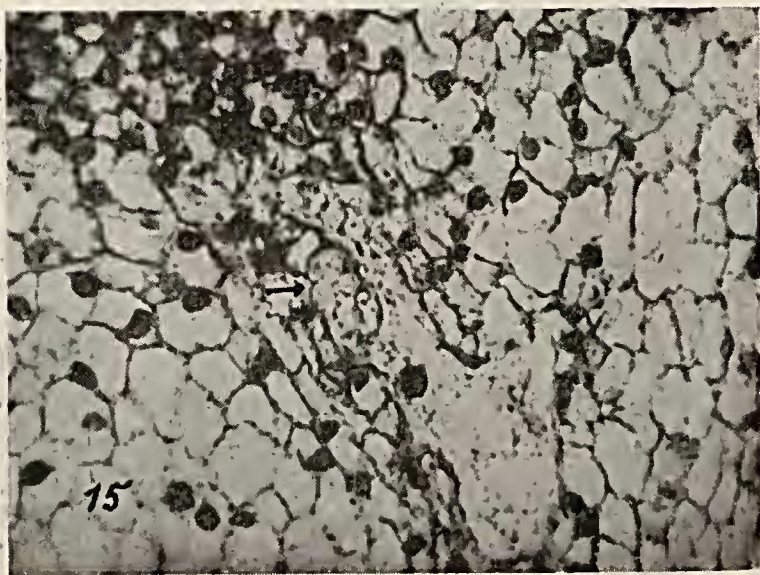
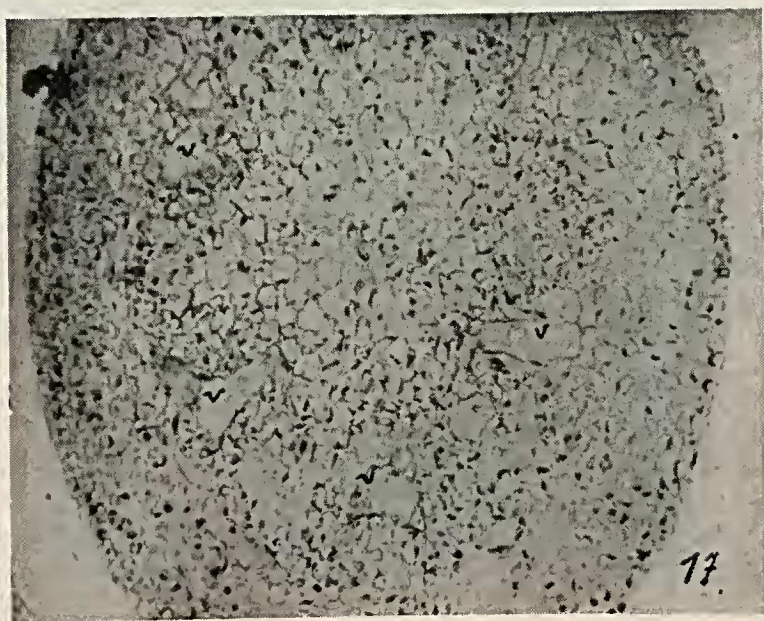
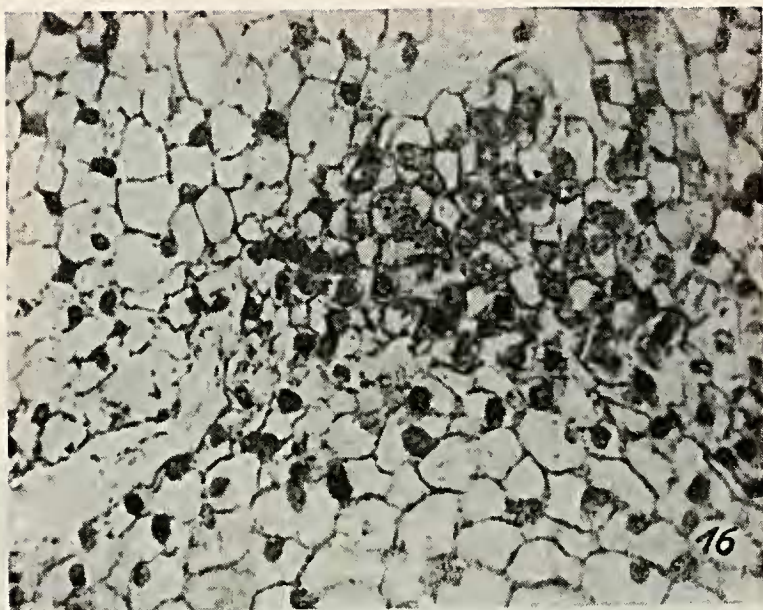
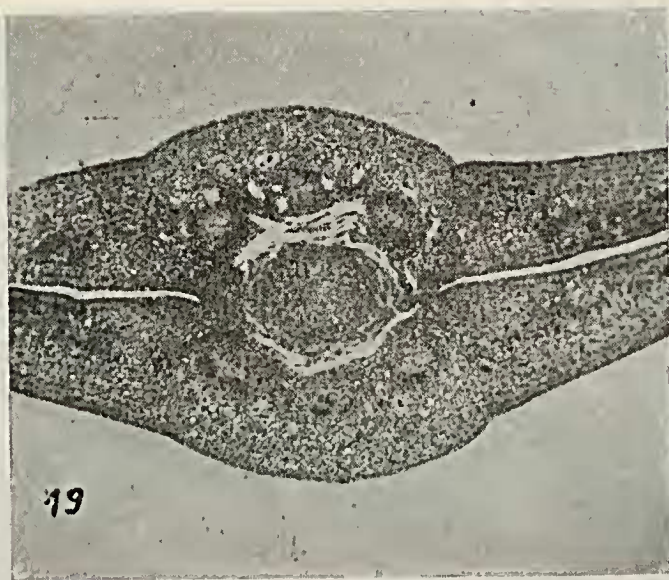
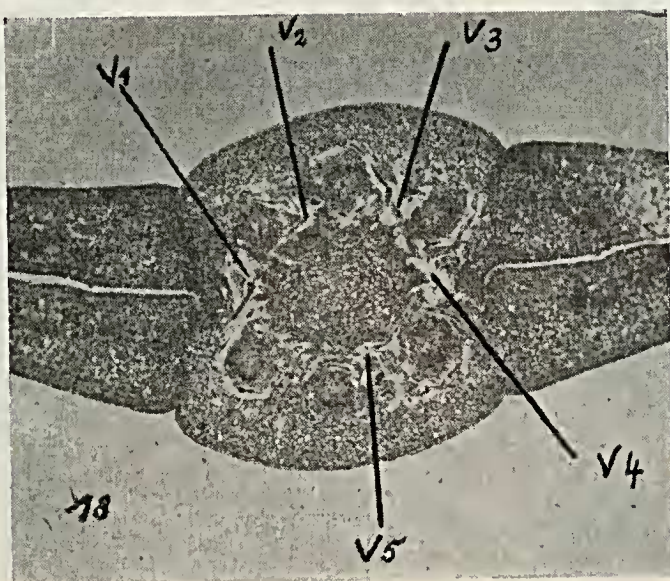
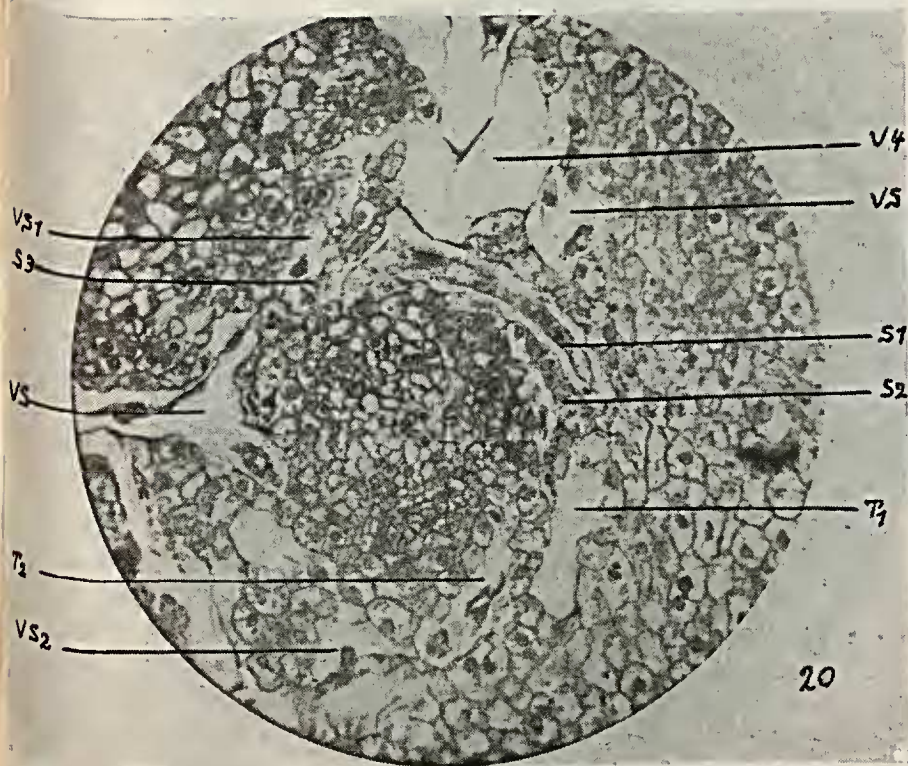
V4
VS
VS1
S3
S1
S2
VS
T1
T2
VS2
20

ESTAMPA X

FOTO 20-A

FOTO 20-B

FOTO 21

409

24

25

FOTO 26

27

ESTAMPA XVII

30

B
C
A
31
32

FOTO 33

FOTO 34

35
P
P'

36
P
R

37

N.G.
g
g
g
g
g
38

FOTO 39

3
V1
V2
1
2
V3
40

40A
40B

421

43

44

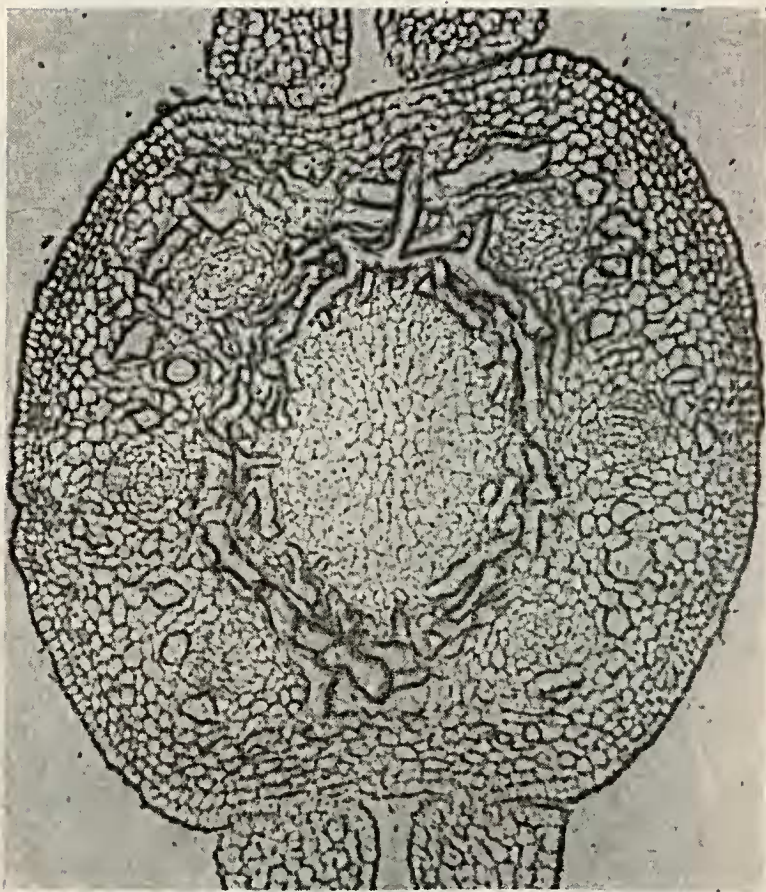
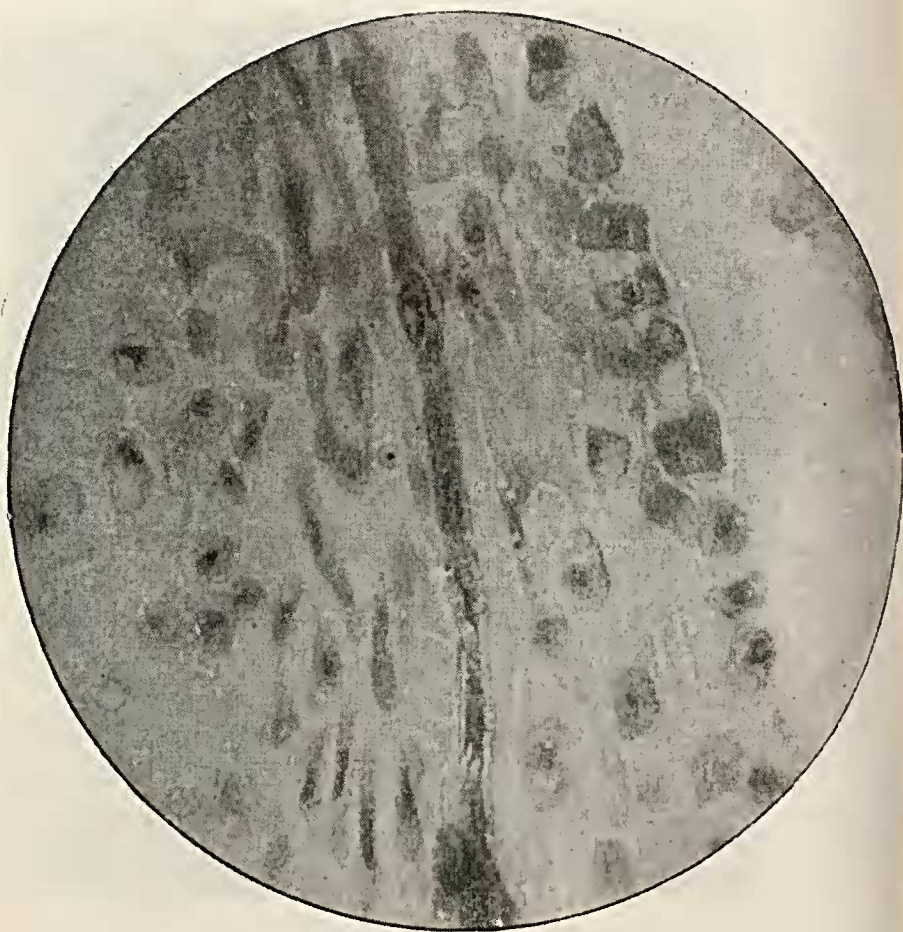
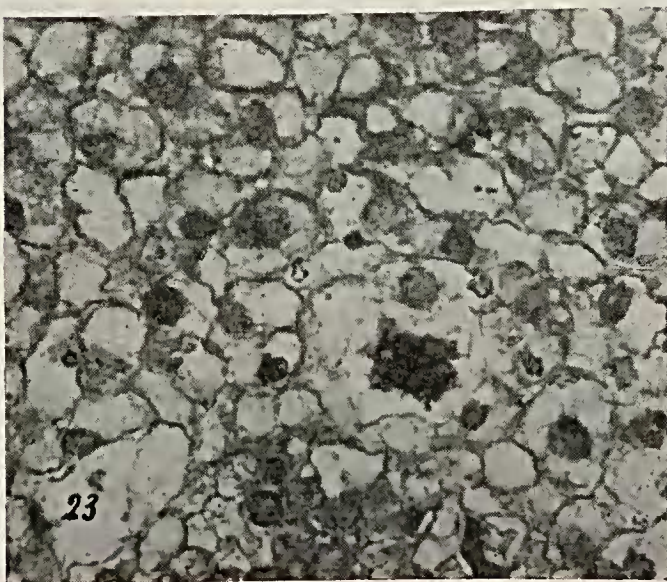
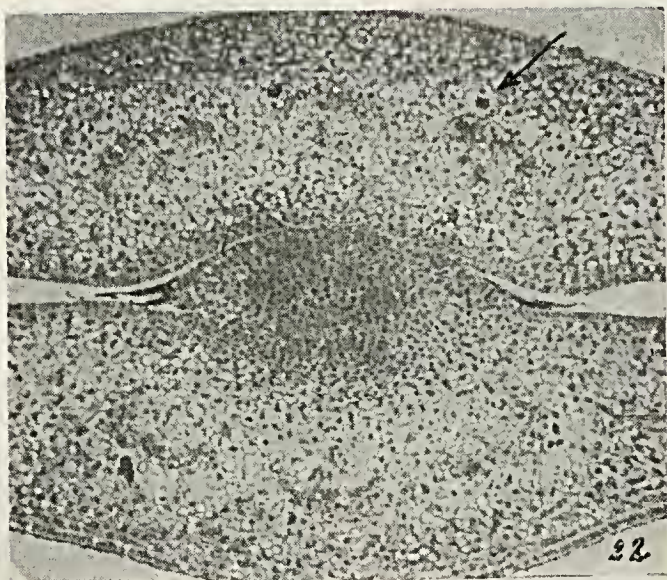
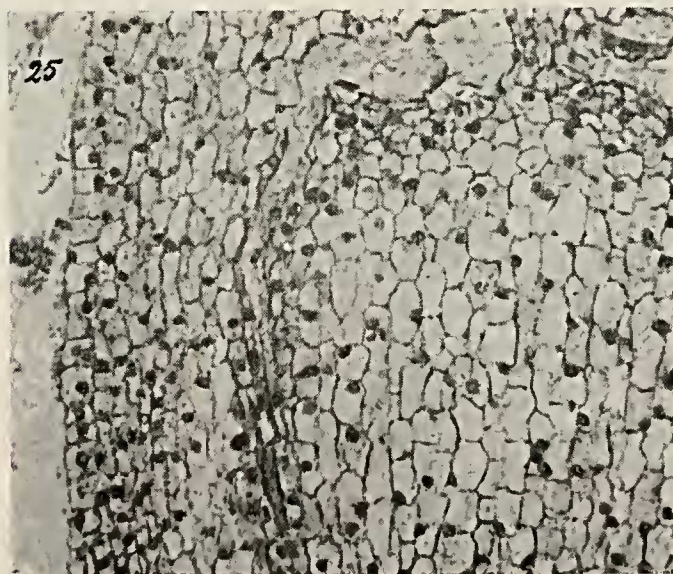
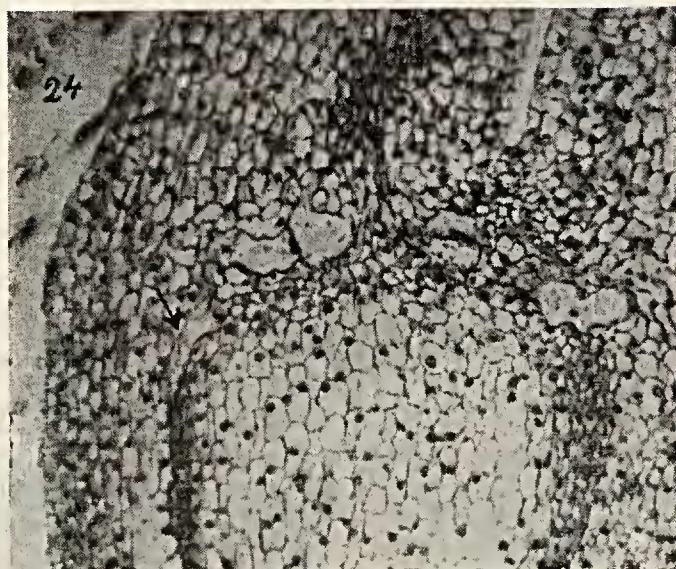
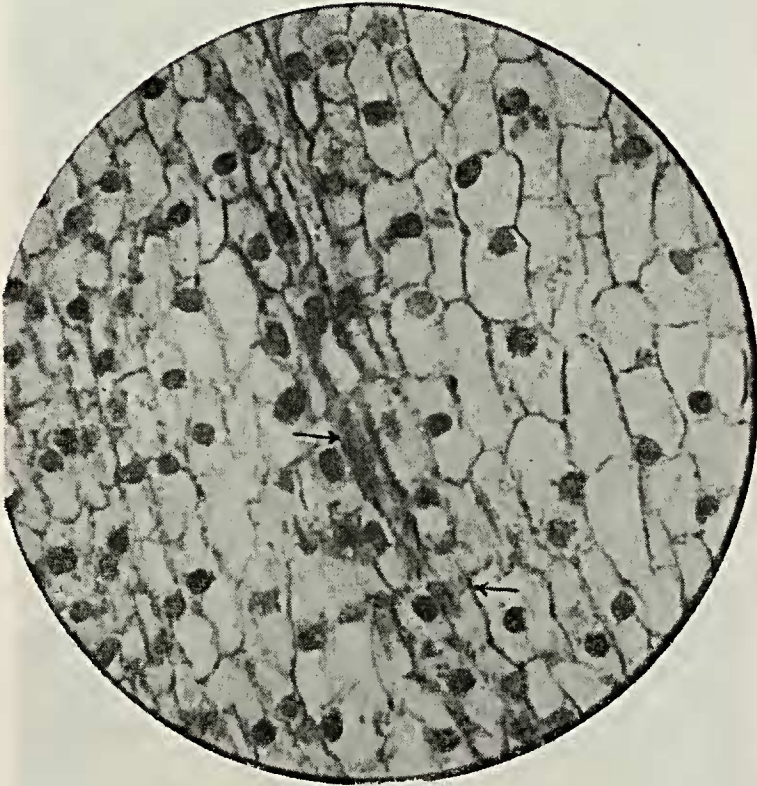
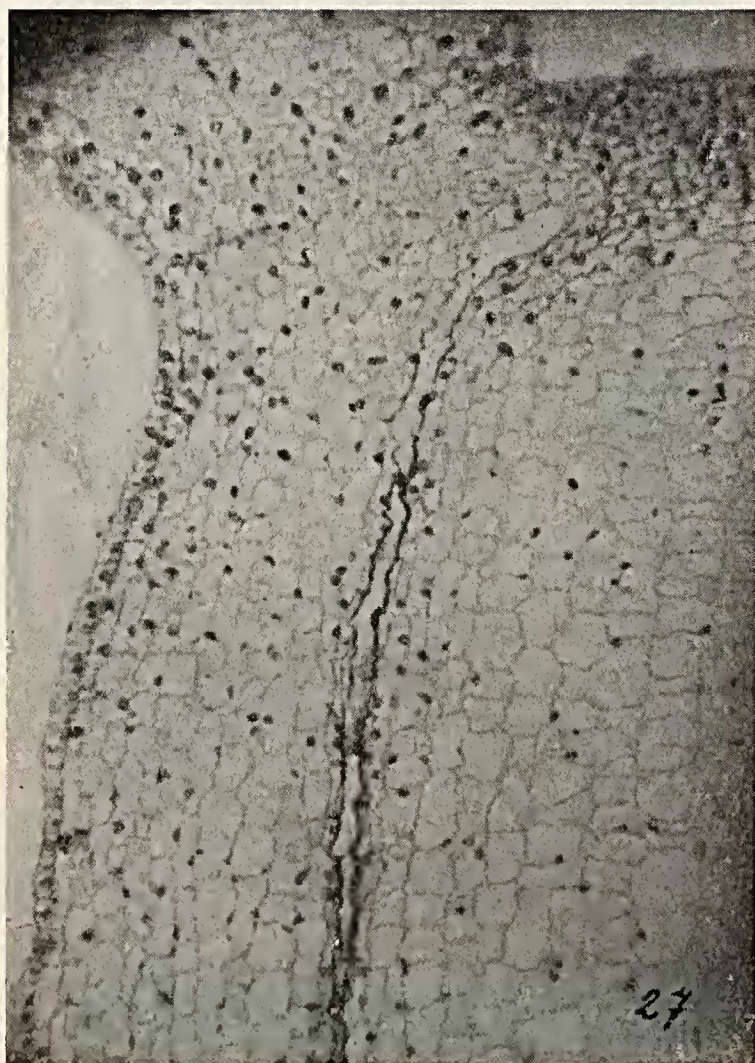
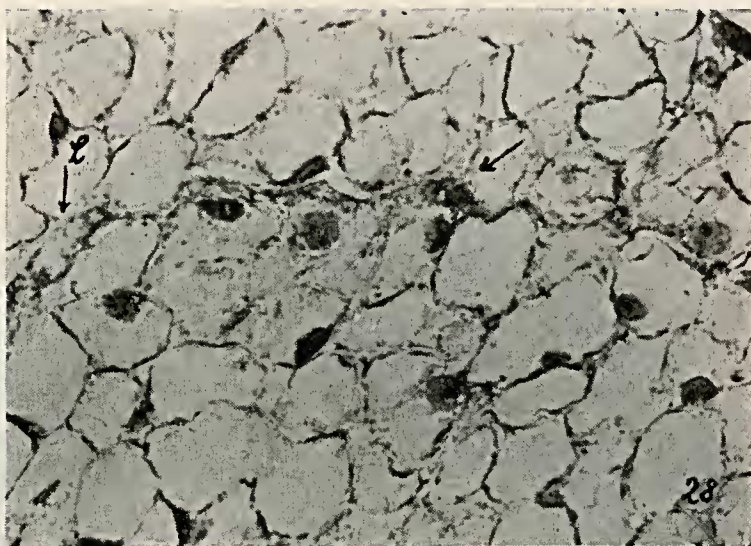
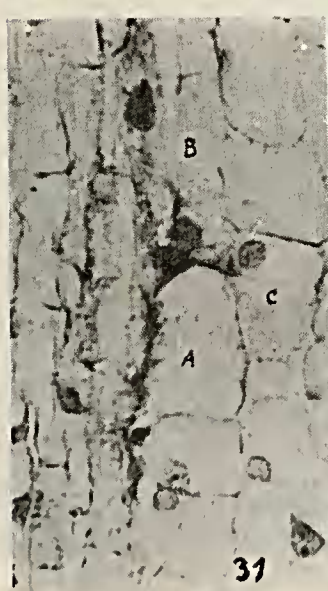
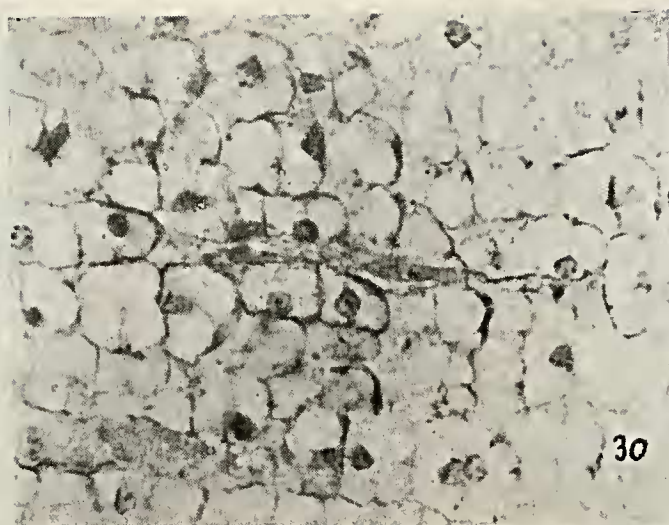
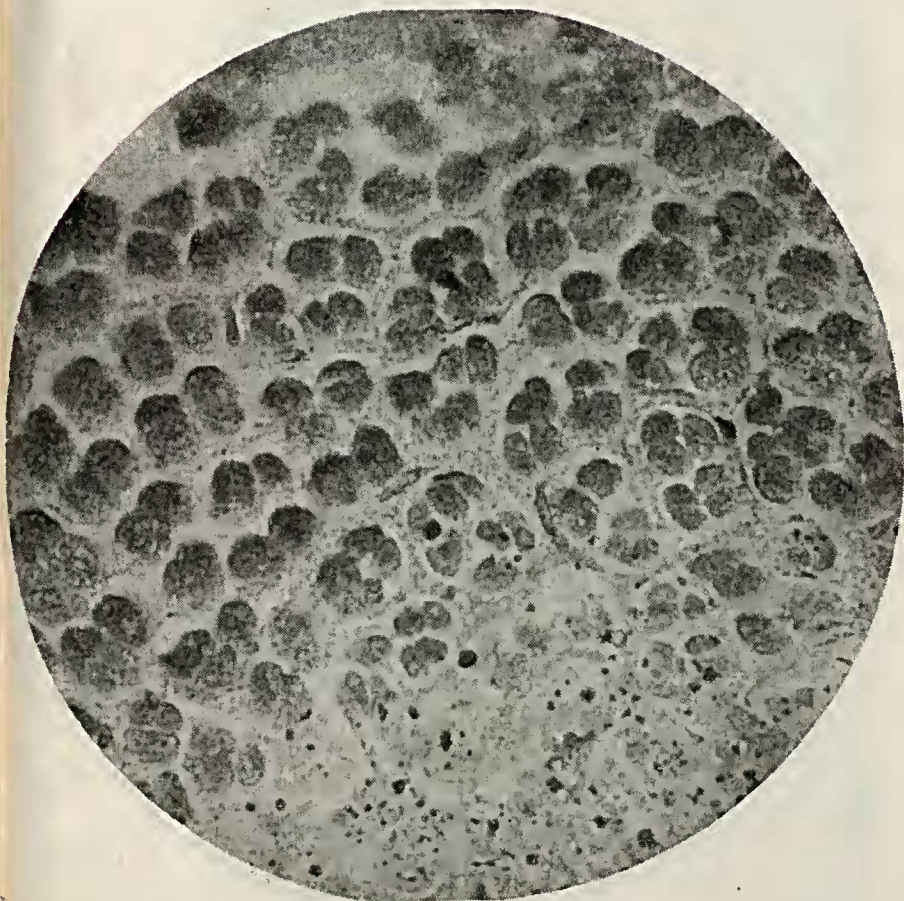
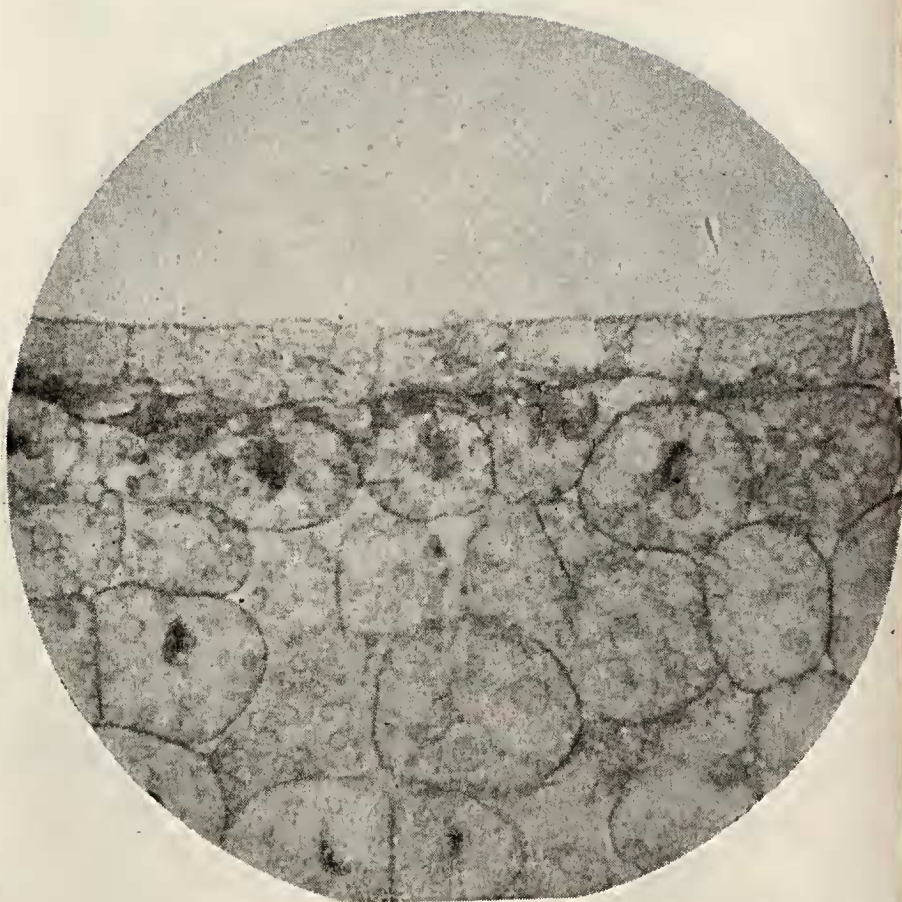
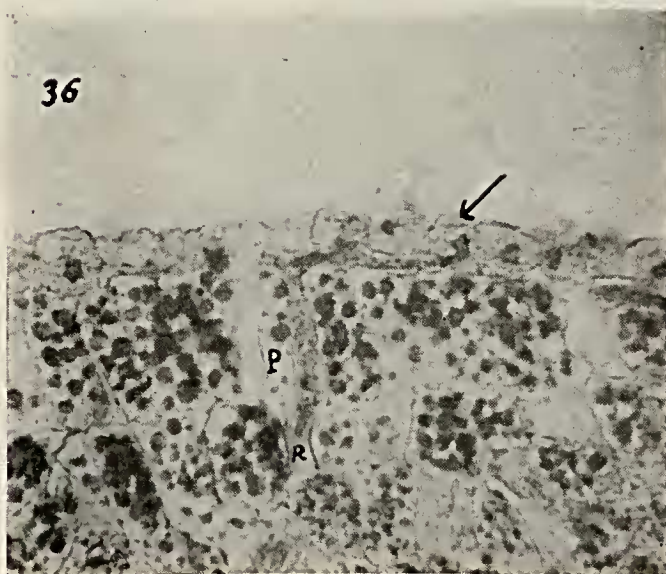
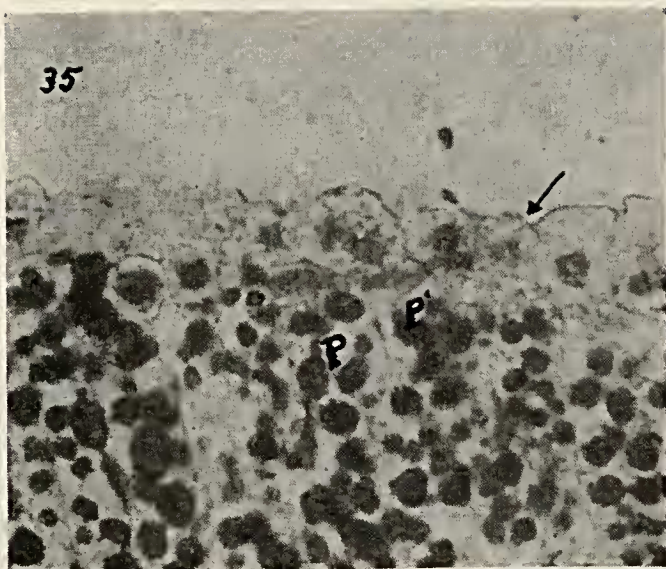
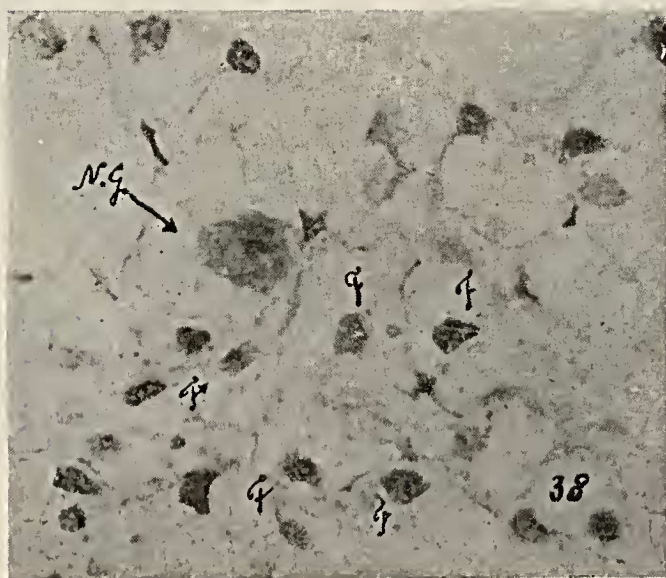
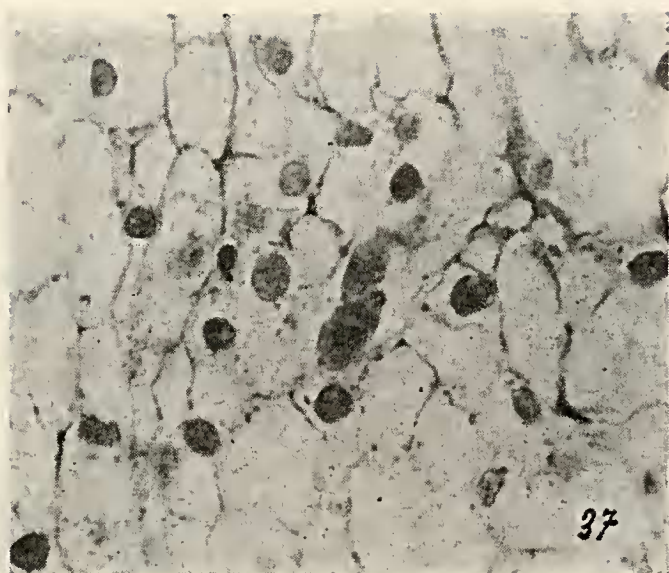
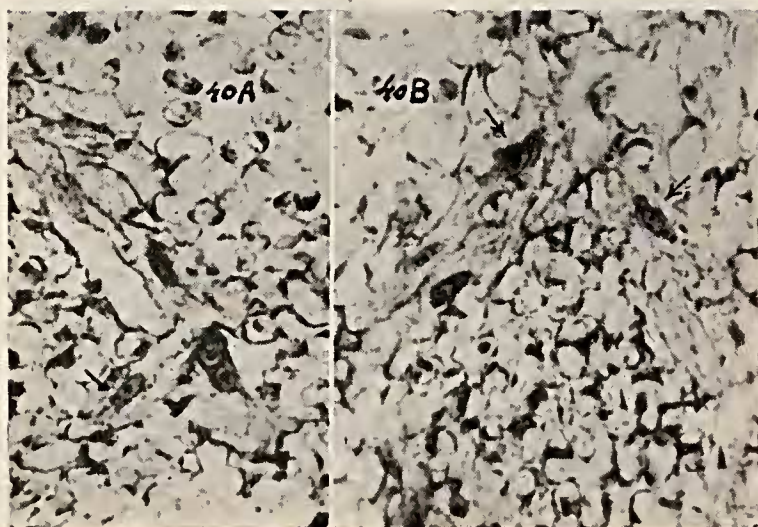
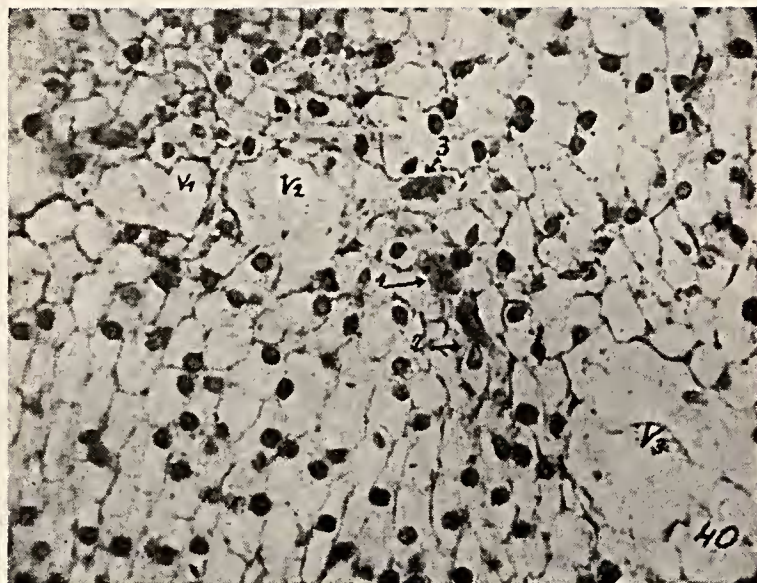
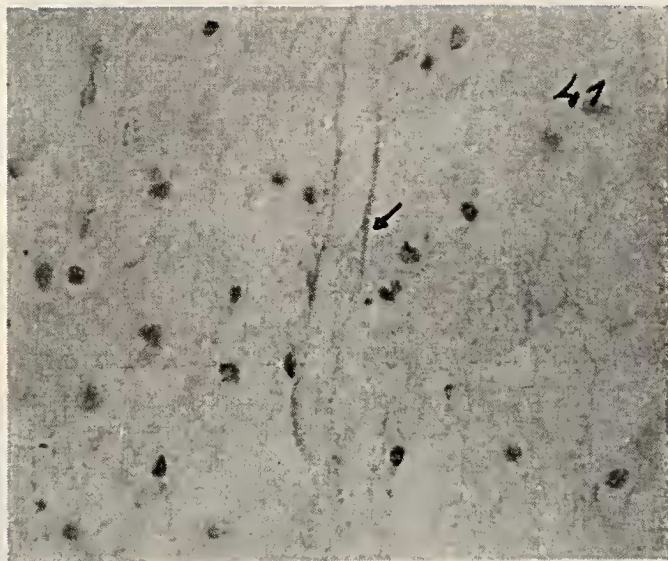
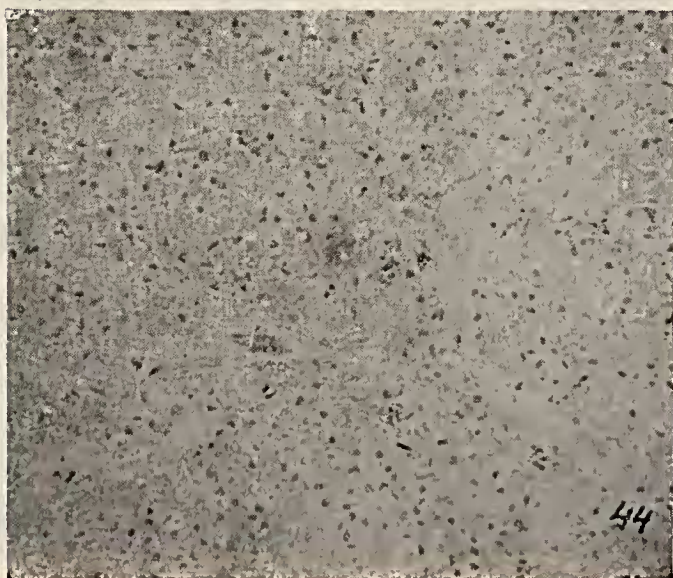
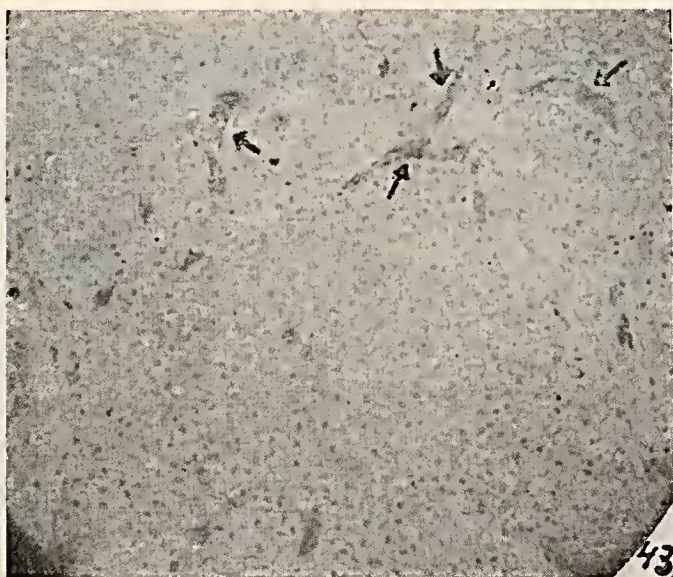
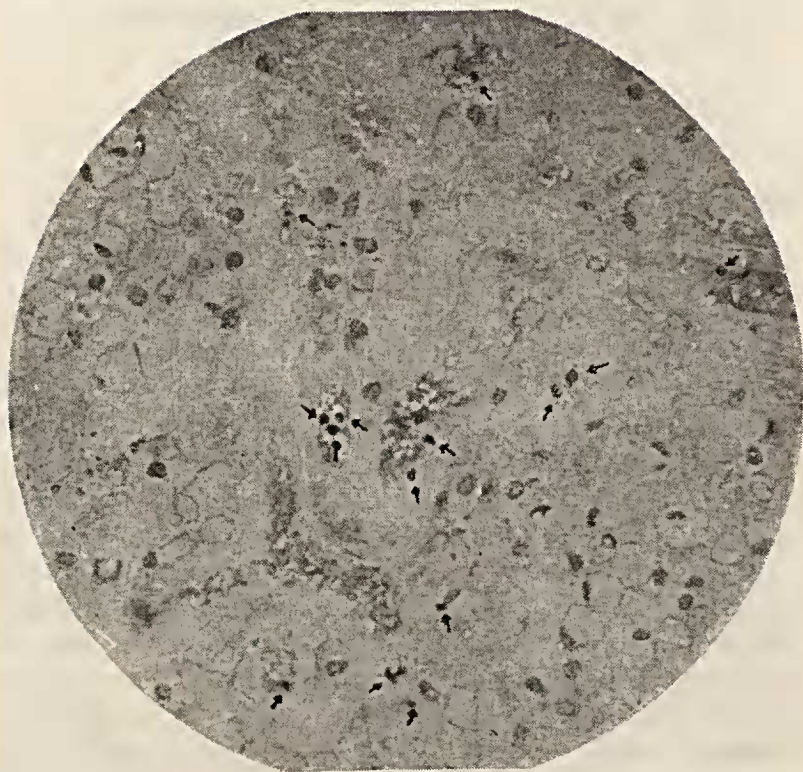



FOTO 45

.425

APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA AO ESTUDO DOS LATICÍFEROS EMBRIONÁRIOS DE EUPHORBIA PULCHERRIMA WILLD *

por

F.R. Milanez e R.D. Machado

Os tubos laticíferos vêm sendo, de há muito, estudados por um de nós, especialmente quanto à sua origem.

Interessando-nos a investigação do mesmo assunto ao microscópio eletrônico, em cortes ultra-finos, aproveitamos a oportunidade do curso ministrado pelo Prof. K.R. Porter, em Julho de 1955 no Instituto de Biofísica, para levar a efeito nossas primeiras experiências.

O primeiro objeto examinado (MATERIAL I) consta de embrião pequeno (ca. de 1,5 mm) de *Euphorbia pulcherrima* Willd, que foi colocado no fixador, ácido ósmico a 1%, pH 6, temperatura ambiente, durante uma hora e, em seguida, cortado em fragmentos menores, que retornaram ao fixador por mais 15 minutos. Teve-se em vista, não só reduzir ao tamanho mais favorável para o corte, mas também permitir a extrusão de latex que fôsse diretamente atingido pelo fixador. Seguiram-se lavagem em tampão e água, desidratação em álcool etílico e inclusão em metacrilato. Realizou-se o corte ultra-fino ao micrótomo Porter-Blum do Instituto de Biofísica.

Já foram promissores êsses resultados preliminares, podendo-se assinalar nas correspondentes micrografias (ns. 5, 6, 7, 8 e 9) alguns fatos importantes.

Micro 5 — Temos repetidamente afirmado que os chamados tubos contínuos, ao invés de se constituírem de células únicas de cresci-

* 1.º Relatório apresentado ao Diretor do Instituto de Biofísica.